VERGLEICHENDE SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DES O1 LIPOPOLYSACCHARIDS UND ANDERER ANTIGENER DETERMINANTEN VON ESCHERICHIA COLI MIT HILFE VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN UND IMMUNSEREN

Inaugural- Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Biologie (23)

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Albrecht Moll

aus Kiel

Berlin ~~1984~~ 1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549615_0015

VERGLEICHENDE SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DES O1 LIPOPOLYSACCHARIDS UND ANDERER ANTIGENER DETERMINANTEN VON *ESCHERICHIA COLI* MIT HILFE VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN UND IMMUNSEREN

Inaugural- Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Biologie (23)

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Albrecht Moll

aus Kiel

Berlin 1984

1. Gutachter: PhD. habil. M. Achtman

2. Gutachter: Prof. Dr. E. R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 1.2.85

Die vorliegende Arbeit wurde am Max- Planck- Institut für molekulare Genetik in Berlin- Dahlem in der Zeit von Januar 1982 bis Dezember 1984 angefertigt.

Für die Themenstellung und die intensive und originelle Art der Betreuung bin ich insbesondere meinem Doktorvater Dr. Mark Achtman dankbar. Umfangreiche Hilfe erhielt ich von Dr. Irene Wilcke, Dr. R. Lührmann und Dr. H. Bazin (monoklonale Antikörper), Dr. H. Gelderblom, Giovanna Morelli und Marion Kamke (Elektronen- Mikroskopie) und Dr. P. Juhr vom Bundesgesundheitsamt, dessen Hilfe die Tierversuche wesentlich erleichterte. Barica Kusećek danke ich für die Einweisung in viele Labortechniken und für die technische Hilfe bei der Durchführung der Agglutinations- Tests. Ohne die Hilfe von Rudi Lurz hätte ich bei der Anwendung des Textverarbeitungsprogramme oft vor Rätseln gestanden. B. Slawig bin ich für das Kaninchen- IgG, Herrn Prof. Dr. Bitter- Suermann für die Überlassung eines monoklonalen Antikörpers , Herrn Prof. Dr. K. Jann für die Überlassung von Polysacchariden dankbar. Hervorheben möchte ich noch die vielfältige und unermüdliche Unterstützung von Dr. Gerd Pluschke. Herrn Prof. Dr. Trautner danke ich für die großzügige Art und Weise, wie er mir hervorragende Arbeitsmöglichkeiten bot. Mein Dank gilt auch Karin Meilick, die mir zeitweise behilflich war sowie allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Achtman.

Für Doris

INHALT

		Seite:
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	**Material**	14
2.1.1	Bakterienstämme	14
2.1.2	Myelom- Zellinien	15
2.1.3	Zellkulturmaterial	15
2.1.4	Zellkulturmedien	15
2.1.5	Antiseren	16
2.1.6	Immunchemikalien	17
2.1.7	Lösungen, Puffer und Chemikalien	17
2.1.8	Sonstige Materialien	26
2.1.9	Geräte	27
2.1.10	Versuchstiere	27
2.2	**Methoden**	28
2.2.1	Membran- Präparation von *E. coli*- Stämmen	28

2.2.2. SDS- Polyacrylamid- Gel-
Elektrophoresemethoden 29
2.2.3. Zellkulturmethoden zur Erzeugung und
Propagierung von Hybridoma- Zellinien 29
2.2.3.1 Kulturbedingungen 29
2.2.3.2 Cryokonservierung 30
2.2.3.3 Viabilitätsbestimmung 30
2.2.3.4 Peritonealzellgewinnung 30
2.2.3.5 Zellfusion 31
2.2.3.6 Methodische Details zu den vier
durchgeführten Fusionen 33
2.2.3.7 Zellklonierung 35
2.2.3.8 Gewinnung von Ascites- Flüssigkeit 38
2.2.4 Affinitätsreinigung von monklonalen
Antikörpern 38
2.2.5 Methode der Immun- Doppeldiffusion 39
2.2.6 Microagglutination 40
2.2.7 Indirekte Immunfluoreszenz 41
2.2.8 Immunogold- Elektronenmikroskopie 42

2.2.9. Western blotting und Immunfärbung 42

2.2.10 Proteinbestimmung 43

2.2.11 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 44

2.2.12 Konjugatherstellung 46

2.2.13 Adsorption von O- Antiseren 46

2.2.14 Inhibitions- ELISA 47

3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE 48

3.1 Immunisierung von Versuchstieren und Isolierung von monoklonalen Antikörpern. 48

3.2 Immunologische und biochemische Charakterisierung der isolierten monoklonalen Antikörper 56

3.2.1 Immunologische Charakterisierung der isolierten monoklonalen Antikörper 56

3.2.2 Biochemische Charakterisierung der isolierten monoklonalen Antikörper 60

3.3. Bestimmung der Antigen- Spezifität der isolierten monoklonalen Antikörper. 64

3.3.1 Bestimmung der Spezifität der monoklonalen Antikörper, die nicht mit dem O1 LPS reagieren. 64

3.3.2 Reaktivität der O1 LPS- spezifischen monoklonalen Antikörper mit verschiedenen E. coli- Stämmen 68

3.3.3 Darstellung der Antigen- Antikörper- Reaktion mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz. 72

3.3.4 Nachweis der in vivo Antigen- Antikörper- Reaktion mit Hilfe der Protein A- Gold- Elektronenmikroskopie 72

3.3.5 Immunologische Untersuchung der Lipopolysaccharid- Typen innerhalb des Serotyps O1 mit Western Blotting. 76

3.4 Untersuchungen des O1 LPS mit Hilfe von Immunseren. 80

3.4.1 Micro- Agglutination von E. coli-
Stämmen und Western Blot
Analyse mit Kaninchen- Immunseren 80

3.4.2 Inhibition der Anti- LPS- Antikörperbindung
durch O- Polysaccharide 86

4. DISKUSSION 89

5. ZUSAMMENFASSUNG 103

6. LITERATURVERZEICHNIS 105

Verwendete Abkürzungen:

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS: Fötales Kälber- Serum
FITC: Fluorescein- Isothiocyanat
HAT: Hypoxanthin- Aminopterin- Thymidin- Zellkultur-Selektionsmedium
HGPRT: Hypoxanthin- Guanin- Phosphoribosyl- Tranferase
HT: Hypoxanthin- Thymidin- haltiges Zellkulturmedium
IgG: Immunglobulin der Klasse G
IgM: Immunglobulin der Klasse M
LPS: Lipopolysaccharid
MPM: Myeloma- Passage- Zellkulturmedium
Omp: Protein der äußeren Membran
PAGE: Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PBS: Phosphat- gepufferte Saline
SDS: Natrium- Dodecylsulfat
TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

1. EINLEITUNG

Das gramnegative Bakterium Escherichia coli gehört zu den Enterobakteriaceen und kommt normalerweise als apathogener Bewohner des Darmtraktes von Mensch und Tier vor. E. coli Bakterien können aber auch eine Reihe von Krankheiten verursachen. Zu diesen zählen sowohl intestinale (23) als auch extraintestinale Erkrankungen wie Pyelonephritis und andere Erkrankungen des Urogenitaltraktes (8). Bei Patienten, die in ihrer Abwehrkraft geschwächt sind, können bestimmte Typen dieser Bakterien eine Sepsis erzeugen, bei Neugeborenen- Meningitis sind E. coli Bakterien häufig die Verursacher (4,71,72). Die Fähigkeit, diese Erkrankungen hervozurufen, scheint mit dem Vorhandensein bestimmter Antigen- Typen auf der Bakterienoberfläche zu korrellieren (60,82).

Eine Unterklassifizierung von E. coli- Stämmen kann mit Hilfe serologischer Kriterien (Serotyp- Bestimmung) und auch durch Untersuchungen des Biotyps (18) vorgenommen werden. Innerhalb eines Serotyps unterscheidet man bei E. coli drei verschiedene Klassen von Antigenen, die aber nicht notwendigerweise alle bei einem Bakterienstamm vorhanden sein müssen:

O- Antigen: thermostabiler Strukturbestandteil des Lipopolysaccharids (LPS)
K- Antigen: Kapselpolysaccharid- Antigen (35)
H- Antigen: Geißel-Antigen

Das LPS von gramnegativen Bakterien besteht aus drei strukturellen und funktionellen Untereinheiten (Abb. 1) (49). Das Lipid A ist eine sehr konservative Struktur, die u.a. für die Verankerung des LPS in der äußeren Membran verantwortlich ist und das eine Vielzahl von biologischen Funktionen hat (49). Die Core- Oligosaccharid- Region zeigt nur wenige Varianten. Bei Salmonellen und bei Escherichia coli sind eine Vielzahl von serologisch unterscheidbaren Typen der O- spezifischen

Seitenkette bekannt. Bis heute werden bei E. coli mehr als 170 O- Antigene unterschieden (57) Die Unterschiede zwischen den einzelnen O- Antigenen liegen in ihrer chemischen Zusammensetzung. Die O- spezifische Polysaccharidkette weist eine hohe Variabilität auf. Abb. 1 zeigt den schematischen Aufbau des LPS von E. coli (aus 60). Von den K- und H- Antigen- Typen sind zur Zeit ca. 100 bzw. 50 unterschiedliche Typen bekannt. Da sehr viele E. coli- Isolate über O-, K-, und H- Antigene verfügen, ist die Anzahl der vorstellbaren O:K:H- Kombinationen nahezu unüberschaubar groß.

Bei der Meningitis von Neugeborenen spielen insbesondere E. coli- Stämme mit dem Kapselantigen K1 eine Rolle (37,52). So haben ca. 80% aller E. coli- Stämme, die aus Fällen von Neugeborenen- Meningitis isoliert wurden, diesen Kapseltyp (71). Dabei dominieren nur wenige O:K- Serotyp- Kombinationen. E. coli- Stämme mit dem K1- Antigen können aber nicht nur aus Krankheitsfällen isoliert werden: Man konnte aus bis zu 40%

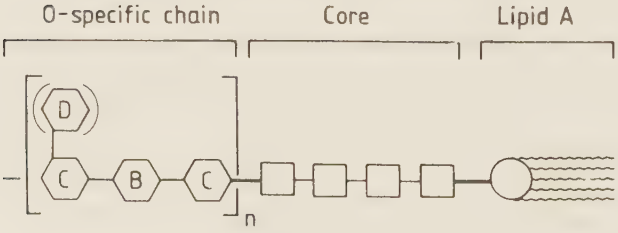

Abb. 1: Allgemeine Struktur des bakteriellen Lipopolysaccharids

aller Analabstriche von gesunden Personen E. coli- Stämme isolieren, die die K1- Kapsel innerhalb ähnlich begrenzter Hauptgruppen von O- Serotypen besaßen (72). Etwa die Hälfte der E. coli- Stämme, die bei der Neugeborenen- Meningitis isoliert werden, gehören zu einem der Serotypen O18:K1, O7:K1, O16:K1 und auch O1:K1 (72). Die Bakterien des Serotyps O1:K1 werden jedoch häufiger in Fällen von Bakteriämie und Pyelonephritis von Erwachsenen gefunden und sind ein weit verbreiteter Serotyp bei fäkalen Isolaten (60,68).

In der Arbeitsgruppe von Dr. M. Achtman wurden mehr als 200 E. coli Isolate, die zum größten Teil dem Kapsel- Typ K1 angehören, untersucht (1). Die zugehörigen O- Serotypen waren O1, O2, O7, O16, O18 und andere. Die untersuchten Bakterienstämme stammten aus erkrankten und gesunden Menschen und wurden im Zeitraum von 1941 bis 1981 isoliert. Bei dieser Untersuchung wurde u.a. die Frage gestellt, ob die verschiedenen Isolate eines Serotyps hinsichtlich anderer unabhängiger Eigenschaften ebenfalls einheitlich sind. Außer dem Serotyp wurden, z. T. in Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern, noch folgende Eigenschaften der Bakterien betrachtet (14,18,21,75):

a) Laufmuster der Hauptproteine der äußeren Membran bei der SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE),
b) Biochemische Stoffwechseleigenschaften (Biotyp),
c) Laufmuster des Lipopolysaccharids (LPS) in der SDS- PAGE,
d) Hämolysinproduktion,
e) Menge der synthetisierten K1- Kapsel,
f) Typ der eventuell vorhandenen Begeißelung,
g) Laufmuster von Isozymen in der Stärke- Gelelektrophorese,
h) Serotyp,
i) Typ der Fimbrien,
j) Plasmidgehalt und Colicinproduktion.

Eine Analyse dieser Daten zeigte, daß es klonale Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb von Gruppen dieser Bakterien gibt (1,58). Solche Klone bestehen aus Bakterienstämmen, die in einer großen Anzahl von unabhängigen Eigenschaften miteinander übereinstimmen und daher als Nachkommen von jeweils einem Bakterium anzusehen sind. Es zeigte sich, daß die Stärke- Gelelektrophorese von Isozymen und die Untersuchung der Laufmuster der Hauptproteine der äußeren Membran besonders geeignet zum Erkennen solcher Verwandtschaften sind. Tabelle 1 gibt eine Übersicht von Standart- Eigenschaften klonaler Gruppen. Die Bakterien des Serotyps O1:K1 werden in Tabelle 1 als zwei Gruppen (Klone) aufgeführt. Einer dieser Klone (mit dem Membranprotein- Muster 9) unterscheidet sich in 17 der untersuchten 27 Eigenschaften von dem anderen Klon (Membranprotein- Muster 5), ist aber gleichzeitig mit einem Klon des Serotyps O18:K1 eng verwandt, da diese beiden Klone in 23 der untersuchten 27 Eigenschaften übereinstimmen. Diese Daten zeigen, daß die ausschließliche Betrachtung des O:K- Serotyps nur von begrenzter Aussagekraft über eine Verwandtschaft von Bakterienstämmen ist.

Eine der 17 Eigenschaften, die die beiden O1:K1- Klone voneinander unterscheiden, liegt im LPS (siehe unten). Diese Tatsache ist insofern bemerkenswert, als daß der O- Serotyp über das LPS definiert wird, man also nur eine einzige LPS- Molekülspezies mit identischen Eigenschaften für alle Bakterien eines O- Serotyps erwarten sollte.

Mit Hilfe einer SDS- PAGE können LPS Moleküle von verschiedenen E. coli- Stämmen in molekulare Spezies mit z. T. unterschiedlicher Länge der O- spezifischen Seitenketten (s. Fig. 1) bzw. unterschiedlichem Laufverhalten aufgetrennt werden (25). Nach einer Silberfärbung (80) kann man im unteren Teil des Gels die Lipid A- Core- Region erkennen, an die sich das langkettige LPS anschließt, das in unterschiedlicher Konzentration 1 bis 47 Oligosaccharid- Wiederholungseinheiten so enthält, daß drei Oligosaccharid- Hauptgruppen zu erkennen

Tabelle 1. Standart- Eigenschaften einiger klonaler Gruppen von Escherichia coli (Daten aus 28)

Prot.[a] Muster	O:K[b]	Anzahl Stämme	H	LPS[c] Typ	Isozyme[d]	NSRROI[e]	Hly[f]	Hydroxamate[g]	P Fimbrien[h]
9	1:1	33	H7	O1A	236 438 363 6333	t--+++	-	+	+
9	2:1	30	?	O2/A	296 438 363 6333	t--+++	-	+	mixed
9	18:1	42	H7	O18/A	276 438 363 6333	t--+++	-	+	-
6	18:1	27	H7	O18/A	276 438 363 6333	---+++	+	-	-
29	2:1	8	H6	O2/E	253 438 363 6552	-+++++	+	-	-
12	16:1	13	H6	O16	256 438 365 6552	+--+++	+	+	+
5	1:1	27	H-	O1A1	833 538 583 6133	+--+--	-	mixed	mixed

[a]: Die Zahlen beziehen sich auf Referenz (1).

[b]: Serotyp.

[c]: Die Bezeichnungen beziehen sich auf Referenz (44) und kennzeichnen die verschiedenen Laufmuster der jeweiligen LPS- Species bei der SDS- PAGE.

[d]: Die dreizehn Ziffern beziehen sich auf die Allomorph-Typen folgender Enzyme (58): Malat-Dehydrogenase; 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase; Adenin-Kinase; Peptid-Enzym 2; Glutamin-Oxoessigsäure-Transaminase; Phospho-Gluco-Isomerase; Aconatase; Mannose-Phosphat-Isomerase; Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase; Alkohol-Dehydrogenase; Esterase; Saure Phosphatase; Leucin-Aminopeptidase.

[e]: Biotyp; N: Nicotinamid- Unabhängigkeit (t= temperaturabhängig); S: Sucrose- Fermentierung; R: Raffinose-Fermentierung; R: Rhamnose- Produktion; O: Ornithin-Decarboxilase; I: Indol- Fermentierung.

[f]: Hämolysin- Produktion.

[g]: Auf Hydroxamat basierendes Eisen- Aufnahme- System (28).

[h]: Fimbrien wurden durch selektive Agglutination von menschlichen Erythrozyten bestimmt (44).

sind (44). Abb. 2 zeigt die Laufmuster von LPS von Bakterien der klonalen Gruppen, die in Tabelle 1 aufgeführt wurden. Die Spuren 1 bis 3 zeigen typische LPS- Laufmuster der Klone, die das Membranprotein- Muster 9 gemeinsam haben. Spur 1 zeigt LPS eines Stammes des Serotyps O1:K1 (LPS O1A), Spur 2 zeigt LPS eines Stammes des Serotyps O2:K1 (O2/9) mit einer charakteristischen Anordnung der Banden in der Form von Doppelbanden. Spur 3 stellt LPS von Stämmen dar, die zum Serotyp O18:K1 gehören, und zwar zur Gruppe des LPS- Typs O18A (M. Achtman, pers. Mitteilung). Dieses Muster korrespondiert mit den beiden O18:K1 Klonen, die in Tabelle 1 aufgeführt sind. Spur 4 zeigt LPS eines anderen Klons innerhalb der O2:K1 Gruppe. Auch hier ist ein typisches Doppelbandenmuster zu erkennen, das jedoch anders läuft als das LPS des vorher erwähnter Klons. Spur 5 zeigt das LPS- Muster von Bakterien des O16:K1- Klons. Spur 6 stellt das LPS des zweiten Klons des Serotyps O1:K1 dar. Ein Vergleich von Spur 1 mit Spur 6 zeigt, daß in Spur 6 alle Banden des O1A LPS vorhanden sind. Zusätzlich tritt hier jedoch stets eine zweite Bande unterhalb dieser gemeinsamen Bande auf (siehe auch Abb. 4, 3.1)

Die klassischen Methoden zur Bestimmung der Serotypen von Salmonellen und Escherichia coli wurden von Kauffmann et al. vor mehr als 40 Jahren entwickelt (38). Sie entwarfen dabei ein Typisierungsschema, das auch heute noch von klinischer Bedeutung ist. Dabei wird der O- Serotyp eines bestimmten Bakterienstammes klassischerweise dadurch bestimmt, daß eine gekochte Bakterienkultur mit einem Antiserum inkubiert wird. Falls das Antiserum O- spezifische Antikörper in genügender Menge und Art enthält, kann man nach einiger Zeit eine mehr oder minder starke Agglutinationsreaktion beobachten. K- und H (Flagellen)- Antigene werden auf ähnliche Art bestimmt. Innerhalb jeder dieser Antigenklassen ist eine Vielzahl von unterschiedlichen Kreuzreaktionen bekannt. Solche Kreuzreaktionen sind dabei sowohl innerhalb als auch außerhalb der jeweiligen Spezies beobachtet worden (38,60).

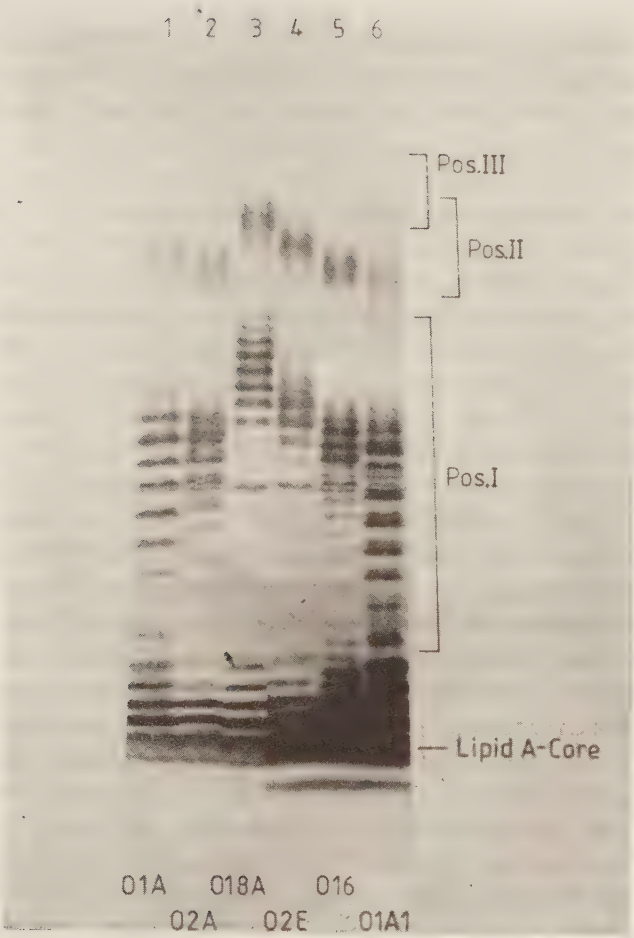

Abb. 2: LPS-Muster von E. coli K1 Klonen (aus 44, dort auch die Bakterienstämme). Spur 1 (Stamm- Nr.): O1A LPS (41), Spur 2: O2A LPS (235), Spur 3: O18/A LPS (102), Spur 4: O2E LPS (275), Spur 5: O16 LPS (203), Spur 6: O1A1 LPS (9)..

Ein allgemeines Problem beim Arbeiten mit solchen konventionellen Antiseren liegt darin, daß jedes einzelne Tier eine individuelle Immunreaktion auf ein verabreichtes Antigen(-ge-

misch) zeigt, so daß jedes dieser Antiseren als einzigartige und mengenmäßig limitierte Antikörperquelle zu betrachten ist, die eine große Menge an Antikörpern unbekannter Spezifität enthält.

Um das Problem der unspezifischen Reaktionen zu beseitigen, können diese Antiseren mit Bakterien, die das interessierende Antigen nicht besitzen, adsorbiert werden. Hierbei sollen dann die "unspezifischen" Antikörper mit den Bakterien Immunkomplexe bilden, die durch Zentrifugation aus dem Antiserum entfernt werden können. Nachteile dieser Methode sind z. B., daß man nicht weiß, welche Antikörper in welch einem Ausmaß aus dem Antiserum entfernt werden und inwieweit die spezifische Aktivität des Serums durch diese Prozedur beeinflußt wird.

Antiseren werden durch Immunisierung von Versuchstieren mit einem interessierenden Antigen erzeugt. Der Anteil der Immunglobuline beträgt bei Mensch und Tier ca. 20% der Serumproteine. Alle Immunglobuline bestehen aus einem konstanten und einem variablen Teil. Der konstante Teil ist für alle Antikörper einer Immunglobulin- Klasse gleich. Der variable Abschnitt ist der Teil des Antikörper- Moleküls, der eine antigene Determinante eines Antigen- Moleküls binden kann. Die einzelnen Immunglobulin- Klassen unterscheiden sich sowohl in biologischer als auch in biochemischer Hinsicht. So werden z.B. bei der Maus folgende Subklassen unterschieden: IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Die Klasse der IgM- Antikörper ist bei der Maus wesentlich effizienter bei der Aktivierung des für die Immunabwehr wichtigen Komplementsystems als die Antikörperklasse IgG1 (53). Bei anderen Tieren liegen ähnliche Verhältnisse vor. Biochemisch unterscheiden sich die Antikörper-Subklassen durch das Ausmaß an Sequenzhomologie, Antigenität sowie durch den Anteil an Kohlenhydraten voneinander.

Wird ein Organismus mit einem Antigen konfrontiert, werden vermehrt Antikörper gebildet, die mit diesem Antigen reagieren. Damit eine Immunantwort auf diese Art erfolgt, muß das

Antigen einige Bedingungen erfüllen (40). So darf es möglichst wenig Ähnlichkeit mit körpereigenen Substanzen haben, da sonst sinnvollerweise eine Immunantwort vom Organismus unterdrückt wird. Es muß genügend groß sein, um eine Immunantwort hervorzurufen. Bei Proteinen darf dabei im allgemeinen ein Molekulargewicht von 10.000 nicht unterschritten werden.

Im Verlauf einer parenteralen Immunisierung, d.h. einer absichtlich herbeigeführten Konfrontation eines Organismus mit einem oder mehreren Antigenen, steigt der Antikörpertiter gegen diese erheblich an (siehe Abb. 3). Besonders nach einer erneuten Immunisierung (Booster) steigt der Antikörpertiter stark an. Während zu Beginn einer Immunantwort Antikörper der IgM- Klasse vorherrschen, nimmt deren Anteil in den meisten Fällen im weiteren Verlauf ab und wird bei einer erneuten Immunisierung hauptsächlich durch Antikörper der IgG- Klasse ersetzt, die auch mengenmäßig den IgM- Anteil übertreffen. Wenn man nun Antikörper aus dem Blut eines Versuchstieres isoliert, so erhält man neben den polyklonalen Antikörpern mit Spezifität für das eingesetzte Antigen eine große Menge von Antikörpern, die aus der natürlichen, nicht durch die Immunisierung induzierten Antikörperbildung des Tieres stammen. Diese natürlichen Antikörper sind zum Teil gegen darmbewohnende Bakterien gerichtet (40).

Da in vielen Fällen keine absolut reinen Antigene zur Verfügung stehen, enthalten die gewonnenen Antiseren oft auch Antikörper mit Spezifität für die anderen in der eingesetzten Präparation enthaltenen Komponenten.

Eine elegante Lösung zur Herstellung von monospezifischen Antikörpern bietet die Anwendung der Hybridoma- Technik, die von Köhler und Milstein 1975 entwickelt wurde (43). Dabei wird auf den Gebrauch von Immunseren verzichtet. Anstelle dessen werden in der Regel die Antikörper produzierenden Zellen der Milz verwendet, um Antikörper in vitro zu erzeugen. Jeder B-Lymphozyt produziert nur eine einzige Art von Antikörpern mit

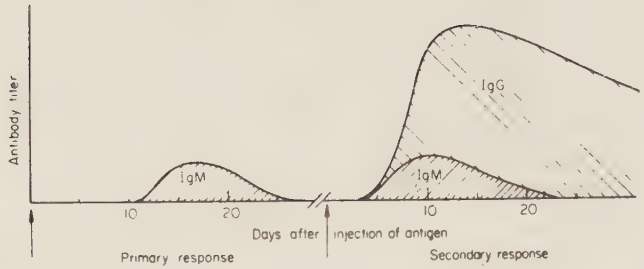

Abb. 3: Serumantikörper bei der Primär- und Sekundärreaktion (aus 53).

nur einer einzigen Spezifität (Monoklonale Antikörper). Um zu einer Antkörperquelle zu gelangen, die nur einen Typ von Antikörpern produziert, muß man also solch eine Zelle isolieren, die Antikörper einer interessierenden Spezifität produziert.

Da die isolierten normalen B- Lymphozyten nach wenigen Tagen in Zellkultur absterben, muß ein anderer Weg gefunden werden, um zu einer "unsterblichen" Quelle von monoklonalen Antikörpern zu gelangen.

Seit vielen Jahren existieren B- Tumorzellinien, die monoklonale Antikörper sezernieren (Myelom- Zellinien) und die sich unter Zellkulturbedingungen unbegrenzt vermehren lassen (69). Diese Myelomzellinien produzieren monoklonale Antikörper einer bestimmten Spezifität. Um Zellinien zu erhalten, die monoklonale Antikörper einer anderen, gewünschten Spezifität

produzieren, verschmilzt man B- Lymphozyten, i.A. aus der Milz eines immunisierten Tieres, und selektiert fusionierte Zellen, die die gewünschten Antikörper produzieren (43). Bei dieser Fusions- Technik werden Zellen verschiedener Herkunft entweder durch Viren (20), Chemikalien (20) oder neuerdings auch durch Spannungsstösse (48) so miteinander verschmolzen, daß Heterokaryons entstehen. Nach Selektion geeigneter Zellklone kan man nun eine große Zellmenge züchten, die einen einzigen definierten Antikörper produziert. Als Fusionspartner verwendet man inzwischen i.A. Myelomzellinien, die selbst keine Antikörper mehr produzieren können. Solche Zellinien wurden von der Maus (z.B. P3-X63-Ag 8.6.5.3 (39)) und auch von der Ratte (IR983F (3))isoliert.

Der Erfolg solcher Zellfusionen hängt von einer Reihe von Faktoren ab. Eine Grundvoraussetzung ist jedoch, daß sich die benötigten selektiven Kulturbedingungen für die zu erzeugenden Hybridzellinien aus den Eigenschaften der fusionierten Zellen herleiten lassen. In dem Selektionsverfahren von Littlefield (47), das auch Köhler und Milstein benutzten (43), wurde eine Myelomzellinie des Mäusestammes BALB/c verwendet, die als Mutante nicht mehr in der Lage war, ein bestimmtes Enzym zu produzieren. Dieses Enzym, Hypoxanthin- Guanin- Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT), ist für den Nukleinsäurestoffwechsel der Zelle von Bedeutung. Abb. 4 zeigt schematisch die Funktion von HGPRT bei den Purin- Synthesewegen der Zelle und den Einfluß des Folsäureanalogs Aminopterin auf einen dieser Wege. Um nach einer Zellfusion zu verhindern, daß neben fusionierten Zellen auch nicht fusionierte Myelomzellen wachsen, wird dem Medium Aminopterin zugesetzt. Das Aminopterin hemmt den Stoffwechselweg zu Guanosin- Monophosphat durch Hemmung der Dihydro- Folsäure- Reduktase. In normalen Zellen kann als alternativer Stoffwechselweg unter Einsatz des aktiven Enzyms HGPRT durch Verwendung von externem Hypoxanthin solch eine Hemmung kompensiert werden, so daß die Zellen weiterhin Nukleinsäuren synthetisieren und sich teilen können. Da die verwendeten Myelomzellen $HGPRT^-$ sind, können sie Purine nur de novo syntheti-

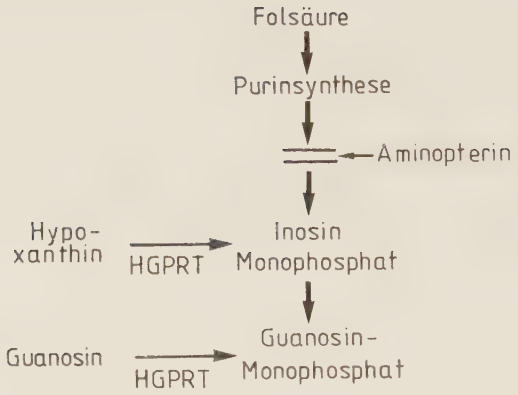

Abb. 4: Einfluß von Aminopterin auf den Purinstoffwechsel.

sieren. Dieser Stoffwechselweg wird ihnen jedoch durch das Aminopterin blockiert (Abb. 4), so daß sie sich in dem Selektionsmedium nicht mehr teilen können. Die fusionierten Zellen können sich unter diesen Bedingungen jedoch teilen, da die genetische Information zur Bildung von aktivem HGPRT von den Milzzellen bereitgestellt wird. Gegen nicht fusionierte Milzzellen brauchte nicht selektioniert werden, da normale Zellen sich nicht in vitro teilen, sondern nach wenigen Tagen absterben.

Die von solchen Zellen produzierten monoklonalen Antikörper haben gegenüber herkömmlichen Immunseren folgende Vorteile:

- nur eine antigene Determinante wird erkannt
- nur eine Sub- Klasse von schweren und leichten Polypeptidketten wird segregiert
- die Antikörper lassen sich in großer Menge reproduzierbar herstellen

Im Bereich der Bakteriologie sind monoklonale Antikörper u.a. schon eingesetzt worden, um Studien zur Epidemiologie und zur Klassifizierung von Mycobakterien durchzuführen (24,54). Der vorteilhafte Gebrauch von monoklonalen Antikörpern ist u. a. auch in Arbeiten über Pseudomonas- und Neisseria- Spezies beschrieben worden (27,78).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten in einer ersten Reihe von Fusionsexperimenten Maus X Maus monoklonale Antikörper isoliert werden, die nur mit dem O1A LPS reagieren. In einer zweiten Versuchsreihe sollten Ratte X Ratte monoklonale Antikörper isoliert werden, die nur mit dem O1A1 LPS, aber nicht mit dem O1A, O1B und O1C LPS reagieren. Mit Hilfe dieser hochspezifischen Reagenzien sollte versucht werden, die offensichtlich widersprüchlichen Ergebnisse der konventionellen Serologie (ein O1- Serotyp, vier unterscheidbare Molekülspezies bei der SDS- PAGE, siehe im Folgenden) einer Klärung zuzuführen. Außer LPS- spezifischen monoklonalen Antikörpern sollten auch solche mit anderen Spezifitäten isoliert werden, um vergleichende Untersuchungen der äußeren Membran von E. coli durchführen zu können. Die serologischen Untersuchungen des O1 LPS mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern sollten durch Experimente mit herkömmlich erzeugten Immunseren ergänzt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Es wurden die folgenden E. coli- Stämme verwendet (aus 1):

Nr.[a]	Stamm-bezeichng.	Serotyp O:K:H	Herkunft	Membranprot. muster
1	A15	1:1:-	USA	5
2	RS168	1:1:-	USA	5
3	A23	1:1:-	Belgien	5
7	A112	1:1	Finnland	5
9	A109	1:1:-	Finnland	5
13	A202	1:1	Grossbr.	5
22	A198	1:1	Grossbr.	3
24	A225	1:1	Grossbr.	5
26	A263	1:1	Schweden	5
27	A25	1:1:7	Dänemark	9
33	A265	1:1	Schweden	9
41	A110	1:1	Finnland	9
47	A205	1:1	Grossbr.	9
54	A190	1:1	Niederl.	9
58	A226	1:1:7	Grossbr.	9
59	A47	1:?:-	Schweden	2
60	A206	1:?:20	Grossbr.	23
61	A221	1:?:20	Grossbr.	23
62	A209	1:?:7	Grossbr.	26
165	A76	7:1	Grossbr.	3
102	RS228	18:1:-	USA	6
205	A284	16:1:-	Schweden	12
232	A34	?:1	USA	14
192	A275	7:1	Schweden	15
133	A158	18:5:5	Grossbr.	11
123	A62	18:5:7	Finnland	18
	P400(K-12)	-:-:?	P. Reeves, Australien	

[a]: Die Numerierung entspricht der aus (1)

Folgende Typisierungsstämme (O- Serotyp) wurden von F. und I. Ørskov, E. coli- Zentrale der WHO, Kopenhagen, bezogen: A183a (O1), U9-41 (O2), Bi 8337-41 (O10), Su4411 (O14), U 18-41 (O50), Bi 7327-41 (O53), H 705 (O107), 27w (O115), 30w (O117), E519-66 (O148), D616 (149), 1935 (O150), E 1541-68 (O154).

2.1.2 Myelom- Zellinien

Die verwendete BALBc Maus- Myelomzellinie P3-X63-Ag 8.6.5.3 (39) wurde von Dr. G. Köhler im Basel Institut für Immunologie isoliert. Sie wurde mir von Dr. R. Lührmann, Berlin, zur Verfügung gestellt. Sie produziert weder schwere noch leichte Immunglobulinketten und ist resistent gegen das Purin- Analog 8- Azaguanin, d.h. sie kann kein aktives Enzym Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyl- Tranferase (HGPRT) produzieren. Dieser Name wird im Folgenden mit P3-X abgekürzt verwendet. Die Ratten- Myelomzellinie IR983F ist ebenfalls ein non- producer von Immunglobulinketten und $HGPRT^-$. Sie stammt von Dr. H. Bazin, Louvain, Belgien, der sie aus dem Ratten- Stamm LOU/M isoliert hatte (3).

2.1.3 Zellkulturmaterial

Zellkulturgefäße und Kunststoffpipetten wurden von den Firmen Nunc (Wiesbaden), Becton-Dickinson (Heidelberg), und Greiner (Nürtingen) bezogen. Die Gewebekulturplatten zum Inkubieren der frisch erzeugten Zellklone wurden von Greiner bezogen. Zum Klonieren von Zellen wurde Methylcellulose (Methocell A4M) von Dow Chemicals (Horgen, Schweiz) und Bacto- Agar (Nr. 0140-01) von Difco (Detroit, USA) verwendet.

2.1.4 Zellkulturmedien

MPM (Myeloma-Passage-Medium) - Zellkulturmedium:

Zur Propagierung der Myelom- und Hybridomazellinien wurde RPMI 1640 (Seromed/Biochrom, Berlin) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) (Seromed/Biochrom, Berlin) und 2 mM L-Glutamin (Gibco, Wiesbaden) verwendet. Antibiotika wurden in einer Konzentration von 60 µg/ml (92 IU) (Penicillin G, Serva, Heidelberg) bzw. 256 µg/ml (Streptomycinsulfat, Serva) allen verwendeten Medien zugesetzt. Zur besseren Pufferung wurden alle Medien mit Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic acid, Calbiochem, La Jolla, USA), pH 7.2, in einer Konzentration von 10 mM versetzt.

HAT(Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin)- Selektionsmedium:

Das Selektionsmedium (47) (HAT- Medium) bestand aus dem Passagemedium MPM mit folgenden Zusätzen: 17.6 µg/ml Aminopterin, 380 µg/ml Thymidin, 1.36 mg/ml Hypoxanthin und 1 mM Natrium- Pyruvat (Sigma, St. Louis, USA) (Endkonzentrationen).

HT Medium war HAT Medium ohne Aminopterin.

8- Azaguanin- Medium:

Zur Überprüfung des Fehlens des Enzyms HGPRT wurden die Myelom- Zellinien regelmäßig in MPM mit 10 µg/ml 8-Azaguanin (Sigma) kultiviert.

Einfriermedien:

Einfriermedium 1: MPM mit Zusatz von 50% FCS
Einfriermedium 2: MPM mit 20% DMSO (Dimethylsulfoxid)

Polyäthylenglycoll für die Fusion:

Zur Zellfusion wurde Polyäthylenglycoll 4000 (für Gaschromatographie, Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 44.4% (Gewichtsprozente) in MPM ohne fötalem Kälberserum eingesetzt. Das Polyethyleneglycoll wurde durch Autoklavieren (120 °C, 30 min., 2.1 bar) gelöst und nach dem Abkühlen mit serumfreiem Medium versetzt.

Tris/Ammoniumchlorid- Lösung:

Diese Lösung enthielt 35 mM Tris und 155 mM NH_4Cl, (pH 7.2).

2.1.5 Antiseren

Die Kaninchen- Antiseren S813 und S815 wurden mir von D. Matthiessen überlassen. Sie wurden durch mehrmalige intravenöse Immunisierung von Kaninchen mit gekochten Kulturen der Stämme A110 (S813) und A109 (S815) wie bei (18) beschrieben erzeugt.

2.1.6 Immunchemikalien

Immunchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma bezogen. Die Ziege- anti- Kaninchen IgG (Fc- spezifisch) und Ziege- anti- Kaninchen IgM (µ- chain spezifisch)- Peroxidase- Konjugate wurden von Cappel Laboratories (Malvern, USA) (Katalog- Nr. 3212-0201 bzw. 3212-0121) bezogen. Ziege- anti- Peroxidase stammte von Sigma (Nr. P-5774). Es wurden die alkalische Phosphatase von Sigma, Nr. P-6774 und Glutaraldehyd 25%ig von Fluka AG (Buchs, Schweiz), Katalog- Nr. 49625 verwendet. Die Protein A- Gold- Konjugate wurden von Janssen Pharmaceutica (Beerse, Belgien) bezogen. Die Seren zur Bestimmung der Immunglobulin- Subklassen wurden von Litton Bionetics (Charleston, USA) bezogen. Es wurden die Kaninchen- anti- Maus bzw. Ziege- anti- Rattenimmunglobulin- Peroxidase- Konjugate von Byk- Mallinckrodt (Dietzenbach) verwendet. Das affinitätsgereinigte Kaninchen- IgG wurde mir von B. Slawig, Berlin, zur Verfügung gestellt. Der Core- spezifische monoklonale Antikörper 786- D10 (IgG3) wurde mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Bitter- Suermann, Mainz, zur Verfügung gestellt wurde. Herrn Prof. Dr. Bob Jann, Freiburg, danke ich für die Uberlassung von Polysacchariden, die er aus Lipopolysacchariden isoliert hat.

2.1.7 Lösungen, Puffer und Chemikalien

Bakterienmedium:

Escherichia coli- Stämme wurden in L- Broth kultiviert:

10.0 g/l Bacto- Tryptone (Difco)
5.0 g/l Yeast- Extrakt (Difco)
10.0 g/l NaCl
1 Pellet NaOH
30 min. bei 120 °C autoklavieren.

Beschichtungspuffer für ELISA- Platten:

Zum Beschichten der ELISA- Platten (96- Loch- Platten mit Flachboden, Greiner, Nürtingen, Nr. 655 101 und Linbro, Hamden, USA, Nr. 76-381-04) mit Antigen wurden Membran- Präparationen in folgendem Puffer verdünnt und inkubiert (84):

Carbonatpuffer:

1.59 g/l Na_2CO_3
2.93 g/l $NaHCO_3$
0.20 g/l NaN_3
pH 9.6

LPS zur Beschichtung der ELISA- Platten wurde in PBS/$MgCl_2$ verdünnt (34).

PBS/$MgCl_2$:

PBS:

8.0 g/l NaCl
0.2 g/l KH_2PO_4
2.9 g/l Na_2HPO_4
0.2 g/l KCl
pH 7.4

$MgCl_2$:

2.03 g/l $MgCl_2$

PBS/Tween:

Der Waschpuffer für ELISA- Platten (84) bestand aus PBS mit 0.05% Tween 20 (Serva).

Absättigungspuffer:

Der Puffer zum Absättigen der Protein- Bindungsstellen auf Nitrozellulose war PBS/Tween mit 1% Rinder- Serumalbumin (BSA, Sigma) für Protein- Blots bzw. PBS mit 1% BSA für LPS- Blots.

Puffer für die Immunogold- Elektronen- Mikroskopie:

Bei der Immunogold- Elektronenmikroskopie wurden folgende Puffer verwendet: PBS mit 0.1% Gelatine (Difco) (PBSG) und TBT.

TBT:

12.1 g/l Tris
5.8 g/l NaCl
2.03 g/l $MgCl_2$
pH 7.5

Coomassie- Farbreagenz:

Zur Proteinbestimmung wurde ein Farbreagenz nach Spector (77) verwendet:

100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250,
gelöst in
50 ml Äthanol 95%ig
100 ml Phosphorsäure 85%ig
850 ml H_2O
nach Filtrierung gebrauchsfertig.

Orthophenyldiamin- Substrat für ELISA mit Peroxidase- Konjugaten:

Der ELISA- Substratpuffer für Peroxidase- Konjugate (84) bestand aus:

24.3 ml 0.1 M Zitronensäure
25.7 ml 0.2 M Na_2HPO_4
50.0 ml H_2O

In je 100 ml davon wurden 40 mg Ortho- Phenylendiamin (Sigma) gelöst. Dazu wurden unmittelbar vor Gebrauch 40 µl H_2O_2 (30%ig) hinzugefügt. Pro Kavität wurden 150 µl Substrat eingesetzt. Die Reaktion wurde nach 30 min. durch Zugabe von 25 µl 9N H_2SO_4/Kavität beendet.

Substrat für alkalische Phosphatase- Konjugate:

Die Stammlösungen für alkalische Phosphatase- Konjugate zur Immunfärbung von Western Blots (5) bestanden aus:

Veronal- Acetat- Puffer:

19.43 g/l Natriumacetat
29.45 g/l Natriumbarbital
0.20 g/l Natriumazid
pH 9.6 Indoxyl- Phosphat- Lösung:

5.0 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (Sigma) in Dimethylformamid

Nitroblautetrazolium- Lösung:

1.0 mg/ml Nitroblautetrazoliumchlorid (Sigma) in Dimethylformamid

$MgCl_2$ (1 M):

203.31 g/l $MgCl_2$

Je 10 ml der Färbelösung bestanden aus:

9.0 ml Veronal/Acetat-Puffer
1.0 ml Nitroblautetrazoliumlösung
0.1 ml Indoxylphosphatlösung
40 µl $MgCl_2$ (1 M)

Material zur Immun- Doppeldiffusion:

Zur Immun- Doppeldiffusion nach Ouchterlony (63) wurde folgender Puffer verwendet:

Barbitalpuffer:

5.6 g/l Diethylbarbitursäure
11.8 g/l Tris(hydroxymethylaminomethan)
0.13 g/l Calciumlactat
0.16 g/l Natriumazid
pH 8.6

Das Agarosegel zur Immundiffusion bestand aus:

10 mg/ml Agarose (Sigma, Nr. A 6013)
5 mg/ml Polyethyleneglycoll 6000
in Barbitalpuffer.

Die Wasch,- Färbe,- und Entfärbelösungen bestanden aus:

Waschlösung:

0.1 M NaCl (5.84 g/l)

Färbelösung:

5.0 g/l Coomassie Brilliant Blue
R 250 (Serva)
100 ml/l Eisessig
450 ml/l Ethanol

Entfärbelösung:

100 ml/l Eisessig
450 ml/l Ethanol

Puffer und Lösungen für die SDS- PAGE

Für die SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (45) wurden folgende Puffer verwendet :

Laufpuffer (pH 8.3) nach Lutgenberg et al. (50):

15.125 g/5l Tris
71.32 g/5l Glycin
10.0 g/5l SDS (Natriumdodecylsulfat, BDH, Poole, GB)

Probenpuffer nach Lutgenberg et al. (50):

25.0 ml Tris, 0.25 M, pH 6.8
2.0 g SDS
10.0 ml Glycerin
5.0 ml ß- Mercaptoethanol (Serva)
1.5 ml 1% Bromphenolblau (Sigma) Acrylamid/ Bisacrylamid 45:1.2

45.0 g/l Acrylamid (Kodak, Rochester, USA)
1.2 g/l Bisacrylamid (Biorad, München)
Acrylamid/ Bisacrylamid 30:0.8

30.0 g/l Acrylamid (Kodak)
0.8 g/l Bisacrylamid (Biorad)

Bei der SDS- PAGE werden folgende Gelsysteme verwendet:

10% Trenngele bestanden aus (45):

5.0 ml 1.5 M Tris pH 8.8
4.6 ml Acrylamid/Bisacrylamid 45:1.2
0.2 ml 10% SDS, zusätzlich (1)
11.0 ml 8 M Harnstoff (Urea, Ultra Pure, BRL, Cambridge, GB) oder H_2O

Nach dem Entgasen wurden pro Gel 90 µl 10% Ammoniumpersulfat und 10 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, Serva) zur Polymerisation hinzugefügt.

Für die Auftrennung von bakteriellen Membranproteinen wurden immer Harnstoff enthaltende Gele benutzt.

7.5%- 25% exponentielle Gradiententrenngele:

7.5%:

7.5 ml 1.5 M Tris pH 8.8
5.0 ml Acrylamid/Bisacrylamid 45:1.2
0.6 ml 10% SDS
15.0 ml 8 M Harnstoff

25%:

3.13 ml 1.5 M Tris pH 8.8
6.92 ml Acrylamid/Bisacrylamid 45:1.2
0.20 ml 10% SDS
3.025 g Harnstoff

Nach dem Entgasen wurde den Trenngellösungen TEMED und 10% Ammoniumpersulfat hinzugefügt:

7.5%:

9 µl TEMED
45 µl 10% Ammoniumpersulfat

25%:

3.75 µl TEMED
6.25 µl 10% Ammoniumpersulfat

Das Sammelgel für die verwendeten Gelsysteme bestand aus:

2.5 ml 0.25 M Tris pH 6.8
2.5 ml Acrylamid/bisacrylamid 30:0.8
50 µl SDS
1.6 ml H_2O

Nach dem Entgasen wurden 10 µl TEMED und 12 µl Ammoniumpersulfat zur Polymerisation hinzugefügt. Alle verwendeten Gele waren 1.2 mm dick. Zum Färben der Gele wurden folgende Lösungen verwendet:

Für Proteinfärbungen:

1) 0.6 g/l Coomassie G 250
35.0 g/l Perchlorsäure

oder:

2) 2.0 g/l Coomassie R 250
100 ml/l Eisessig
500 ml/l Methanol

Zur Anfärbung von LPS wurde eine Silbernitratfärbung nach Tsai et al. (80) verwendet:

Fixierlösungen:

1) 400 ml/l Äthanol
50 ml/l Eisessig
550 ml/l H_2O bidest

2) 400 ml/l Äthanol
50 ml/l Eisessig
7 g/l Perjodsäure
550 ml/l H_2O bidest

Färbelösung:

2 ml 25% NH_4 -Lösung
28 ml 0.1 N NaOH
5 ml 20% $AgNO_3$ -Lösung (Zugabe mit Rühren)
115 ml H_2O

Entwickler:

50 mg/l Zitronensäure
0.5 ml/l 37% Formaldehyd

Stopper:

70 ml/l Eisessig

Für Western Blots wurden entweder ein Phosphatpuffer (für das Blotten von LPS, Harlan Cardwell, persönliche Mitteilung) oder ein Tris/Glycin-Puffer zum Transferieren verwendet.

Phosphatpuffer:

25 mM Phosphatpuffer, pH 7.5

A) 3.00 g NaH_2PO_4-1-hydrat/l

B) 3.55 g Na_2HPO_4-2-hydrat/l

Der Puffer wurde durch Mischen von ca. 1 l Lösung A mit ca. 4.5 l Lösung B auf pH 7.5 eingestellt.

Fünf Liter Tris/Glycin-Puffer bestanden aus:

Tris/Glycin-Puffer, pH 8.3 (20/200mM):

15.1 g/5l Tris
72.1 g/5l Glycin

Zur Vitalfärbung von Myelom- und Hybridomazellen wurde Trypanblau verwendet:

Trypanblau- Lösung:

0.4 g Trypanblau/100 ml PBS

Bei der Affinitätsreinigung von Antikörpern wurden folgende Puffer verwendet:

25 mM Tris/150 mM NaCl (TN):

3.03 g/l Tris
8.77 g/l NaCl
pH 8.0

Zum Eluieren wurde folgender Puffer benutzt:

4 M $MgCl_2$ in TN:

3.03 g/l Tris
8.77 g/l NaCl
813.24 g/l $MgCl_2$-6- Hydrat
pH 8.0

Für die Herstellung eines Antikörper- Enzym- Konjugats wurden folgende Lösungen verwendet:

50 mM Tris/100 mM NaCl:

6.06 g/l Tris
5.84 g/l NaCl
pH 8.0

50 mM Phosphatpuffer:

6.00 g NaH_2PO_4-1-hydrat/l
7.10 g Na_2HPO_4-2-hydrat/l
pH 7.2

2.1.8 Sonstige Materialien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Merck (Darmstadt) bezogen. Bei der SDS- PAGE wurde der Protein- Molekulargewichts- Standard (Nr. 161-0304) von BioRad (Richmond, USA) verwendet. Pristan (2,6,10,14- Tetramethylpentadecane) stammmte von Aldrich (Milwaukee USA). Sarcosyl NL 97 wurde uns freundlicherweise von Ciba- Geigy (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Nitrocellulose, Typ BA 85, 0.45 µm, wurde von Schleicher und Schüll (Dassel) bezogen. Für Western Blots wurde Chromatographie- Papier Nr. 3MM von Whatman (Maidstone, England) verwendet. Zur Affinitätsreinigung von monoklonalen Mäuse- Antikörpern wurde Protein A Sepharose CL 4B von Pharmacia, Uppsala, Schweden, verwendet. Zur Gelfiltration des hergestellten Konjugates wurde Sephacryl S 300 (Pharmacia) in

einer 2.5 x 40 cm langen Säule verwendet. Freund's inkomplettes Adjuvants wurde von Difco gekauft.

2.1.9 Geräte

Die Myelom- und Hybridomazellen wurden bei 5% CO_2 in Begasungsbrutschränken, Typ 5060 E CO_2 von Heräus, Hanau, kultiviert. Für Zellkulturarbeiten wurde ein steriler Arbeitsplatz, Typ EG 4252, von Baker (Sanford, USA) benutzt. Sie wurden mit einem Mikroelisa- Autoreader MR 850, Dynatech (Alexandria, USA) ausgewertet. Die Mikrotiter- Platten für die Mikro- Agglutination wurden von Dynatech bezogen (U- förmiger Boden, Nr. 1-221-24). Die Elektrophorese- Apparatur für Western Blots stammte von Hoefer Scientific (San Francisco, USA) Modell TE42. Zur Herstellung der exponentiellen Polyacrylamidgele wurde ein Gradientenmischer des Typs XPO 77 von Hoefer Scientific verwendet. Für die Ultraschallbehandlung wurde ein Ultraschallgerät, Typ B-30, von Branson (Danbury, USA) verwendet. Zur Bestimmung der Myelom- und Hybridoma- Zellzahl wurde eine Bürker- Zählkammer (0.1 mm Tiefe) (Brand, Wertheim) verwendet. Für affinitätschromatographische Reinigung von Antikörpern wurden Säulen von Amicon (Witten)Typ DC 7x6 verwendet. Dabei wurden ein Spektralphotometer Typ Uvicord 4701 A und eine Peristaltikpumpe vom Typ 12000 Varioperspex, beide von LKB (Bromma, Schweden) benutzt. Es wurde der Kompensationsschreiber des Typs 4012 von Colora (Lorch) eingesetzt. Für Proteinbestimmungen wurde ein Spektralphotometer, Typ PM 6, von Zeiss (Oberkochen) verwendet. Zur Herstellung einer Emulsion aus Freund's Adjuvant und Antigen- Lösung wurde ein Ultra- Turrax- Mischgerät (Typ TP18/10) von IKA (Staufen) verwendet.

2.1.10 Versuchstiere

Die Mäuse des Stammes BALB/c wurden vom Bundesgesundheitsamt, Berlin, bezogen und dort auch gehalten. Die Ratten des Stammes LOU wurden vom Centre National de la Recherche Scientifique, Orléans, Frankreich, bezogen. Sie wurden ebenfalls im Bundesgesundheitsamt, Berlin, gehalten.

2.2 **Methoden**

2.2.1 Membran- Präparation von E. coli- Stämmen (nach 1)

Hierzu wurden die Escherichia coli- Stämme in 100 ml L-Broth bis zur späten exponentiellen Phase (ca. 4 x 10^8 Zellen/ml) schüttelnd mit Belüftung kultiviert und nach dem Abzentrifugieren (14.000 x g, 4 °C, 15 min.) in je 10 ml 10 mM Tris pH 8.0, 4 °C, resuspendiert. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung (80s, 50% Puls, Arbeitsstufe 5) aufgeschlossen. Noch intakte Zellen wurden durch niedertourige Zentrifugation (3.000 x g, 4 °C, 20 min.) pelletiert und verworfen. Die Membranvesikel wurden anschließend durch hochtourige Zentrifugation pelletiert (49.000 x g, 60 min), in 150 µl H_2O resuspendiert und bei -30 °C aufbewahrt. Um Sarkosyl- unlösliche äußere Membranen zu erhalten, wurden 50 µl der Membranpräparation mit 400 µl 1.67 % Sarcosyl und 11.1 mM (Endkonzentration) Tris pH 7.6 für 20 min. bei Raumtemparatur extrahiert. Nach Zentrifugation (45.000 x g, 90 min) wurden sie in 50 µl Elektrophorese- Probenpuffer resuspendiert und bei -30 °C aufbewahrt (1).

Um Membranvesikel teilweise von Lipopolysaccharid zu befreien, wurde eine Detergenzbehandlung vorgenommen (M. Achtman, persönliche Mitteilung). Für diese Behandlung wurden je 40 µl der Membranpräparation mit je 80 µl der Detergenzlösung für 20 min. bei Raumtemparatur inkubiert. Als Detergenzien wurden 2% ß- Glucosid in 100 mM Tris pH 8.3 bzw. 5% Natriumdesoxycholat (DOC) in 100 mM Tris pH 8.3 verwendet. Nach der Inkubation wurden die Membranvesikel durch hochtourige Zentrifugation pelletiert (49.000 x g, 60 min, 20 °C) und in 20 µl H_2O resuspendiert. Durch eine SDS- Gelelektrophoretische Analyse des noch vorhandenen LPS wurde festgestellt, daß der LPS- Gehalt der beiden Proben durch die Detergenzbehandlung um ca. 70% abgenommen hatte.

2.2.2. SDS- Polyacrylamid- Gel- Elektrophoresemethoden

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Membranproteinen wurden Proben (ca. 20- 50 µg Protein, ca. 5 µl) für 2 min. in gleichen Volumina Proben- Puffer bei 100 °C inkubiert und anschließend einer SDS- PAGE unterzogen. Hierbei wurden 10%ige Gele mit Harnstoff verwendet. Die Elektrophorese wurde für ca. 5 h bei 20 mA durchgeführt. Anschließend wurden die Gele in 50%iger Trichloressigsäure (TCA) für 1 h fixiert und über Nacht in Coomassie G 250- Färbelösung bei Raumtemparatur gefärbt und danach in 5%iger Essigsäure entfärbt, bis die blauen Proteinbanden sich deutlich vom klaren Hintergrund hervorhoben. Alternativ hierzu wurden die Gele mit Coomassie R 250- Färbelösung bei 60 °C für 1 h gefärbt und anschließend mit 10%iger Essigsäure, ebenfalls bei 60 °C, entfärbt.

Lipopolysaccharide wurden mit Hilfe von exponentiellen Polyacrylamidgelen (7.5- 25%) aufgetrennt. Hierzu wurden pro Spur 5 µl einer 1:5 Verdünnung von Sarcosyl- unlöslichen äußeren Membranen in 2x Probenpuffer geladen. Die Elektrophorese wurde bei 9 mA für 16 h durchgeführt. Die Gele wurden vor dem Anfärben für ca. zwei Stunden in Fixierlösung 1 und anschließend für fünf Minuten in Fixierlösung 2 fixiert. Nach dreimaligem zehnminütigen Waschen in H_2O bidest wurden die Gele im Dunkeln mit Silbernitrathaltiger Färbelösung zehn Minuten gefärbt. Nach Wiederholung der Waschprozedur wurden die Gele mit dem Zitronensäurehaltigen Entwickler entwickelt. Die Banden waren nach ca. drei bis fünf Minuten gut sichtbar. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Gele in 7%ige Essigsäure gelegt.

2.2.3. Zellkulturmethoden zur Erzeugung und Propagierung von Hybridoma- Zellinien

2.2.3.1 Kulturbedingungen

Die verwendeten Myelom- Zellinien wurden in MPM kultiviert, das mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) versetzt war. Vier bis

sechs Wochen vor einer Fusion wurden die Zellinien in MPM mit 10 µg/ml 8- Azaguanin gehalten, um den Phänotyp ($HGPRT^-$) zu überprüfen. In den zwei Wochen vor einer Fusion wurden die Zellen ständig in der logarithmischen Wachstumsphase (5×10^4- 5×10^5 Zellen/ml) gehalten.

2.2.3.2 Cryokonservierung

Um Zellinien dauerhaft aufbewaren zu können, ist es notwendig, sie in flüssigem Stickstoff zu konservieren. Von den hier verwendeten Zellinien wurden ca. 10^6-10^7 Zellen nach niedertouriger Zentrifugation (100 x g, 10 min.) in 0.5 ml Einfrierlösung 1 resuspendiert und 30 min. auf Eis belassen. Anschließend wurde der Zellsuspension 0.5 ml Einfrierlösung 2 hinzugefügt. Die Zellen wurden in Nunc- Cryoröhrchen langsam auf -70 °C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Cryoröhrchen in einem Wasserbad auf 37 °C gebracht. Die Zellen wurden einmal mit MPM gewaschen und in MPM kultiviert.

2.2.3.3 Viabilitätsbestimmung

Die Viabilität der Kulturzellen wurde mit Hilfe der Trypanblau- Ausschließung (65) bestimmt. Hierzu wurde ein Tropfen einer Zellsuspension mit einem Tropfen der Trypanblau- Lösung auf einem Objektträger (Zählkammer) gemischt. Nach ca. zwei Minuten wurde die Gesamtzellzahl und die Zahl der toten (angefärbten) Zellen bestimmt. Der Anteil der lebenden Zellen lag unter günstigen Kultur- Bedingungen bei über 90%.

2.2.3.4 Peritonealzellgewinnung

Für die Klonierung in Flüssigkultur wurde ein "Feeder Layer" aus Mäuse- Peritonealmakrophagen (20) verwendet. Dieser feeder layer soll dazu dienen, das Wachstum von klonierten

Einzelzellen durch die Abgabe von z. T. unbekannten Substanzen zu fördern (20). Es wurden daher Peritonealmakrophagen gewonnen, die gemeinsam mit den klonierten Einzelzellen kultiviert wurden. Die Makrophagen wurden folgendermaßen gewonnen: Einer Maus wurden 4 ml MPM ohne Serum intraperitoneal injiziert. Nach ca. 5 min. wurde das Tier getötet und die Bauchhöhle steril eröffnet. Mit einer Spritze mit einer 21 G- Nadel wurde die Peritonealflüssigkeit langsam abgesaugt. Die so gewonnenen Makrophagen wurden einmal in MPM gewaschen und in einer Zelldichte von ca. 10^5/ml in MPM gehalten. Pro Maus erhielt man so 3- 6 x 10^7 Makrophagen.

2.2.3.5 Zellfusion

Für eine Fusion wurden die Myelomzellen zweimal in serumfreiem Medium gewaschen. Vor dem zweiten Waschschritt wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Pro Fusion wurden ca. 3 x 10^7 Myelomzellen eingesetzt.

Den immunisierten Tieren wurde nach der Tötung die Milz entnommen, von gröberen Fett- und Bindegewebsresten befreit und in eine Petrischale mit 10 ml serumfreiem Medium gelegt. Anschließend wurde die Milz mit Objektträgern mit Mattglas-Beschriftungsfeld zerrieben, so daß eine Zellsuspension entstand. Diese Suspension wurde von Geweberesten befreit, indem sie 5 min. in einem Zentrifugenröhrchen stehen gelassen wurde. Die obersten 9.5 ml der Suspension wurden in ein neues Röhrchen pipettiert und 5 min. bei 100 x g abzentrifugiert. Dieses Zellpellet wurde in 2 ml eiskaltem Tris/Ammoniumchlorid vorsichtig resuspendiert und 2 min. inkubiert, um die Erythrocyten zu lysieren (41). Anschließend wurde diese Zellsuspension auf 10 ml FCS aufpipettiert und 8 min bei 100 x g zentrifugiert. Aufgrund der hohen Dichte des FCS blieben dabei die lysierten Zellen im Überstand, während die intakten Zellen, also auch die Lymphocyten, pelletiert wurden. Nach dem Absaugen der lysierten Erythrocyten und des FCS wurden das Zellpellet in 10 ml serumfreiem Medium resuspendiert und zweimal in se-

rumfreiem Medium gewaschen. Vor dem letzten Waschschritt wurden die Zellen gezählt. In der Regel erhielt man aus der Milz einer Maus etwa 10^8 Zellen.

Die Milzzellen wurden mit 3 x 10^7 Myelomzellen in einem Zentrifugenröhrchen mit Rundboden gemeinsam pelletiert. Nach dem vollständigen Absaugen des Uberstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Polyäthylenglycol- Lösung (44.4% in MPM ohne FCS) vorsichtig resuspendiert. Zum Verdünnen der Polyethyleneglycollösung wurde folgendermaßen vorgegangen: Nach 1 min. Inkubation der Zellen mit Polyethyleneglycoll wurde unter leichtem Rühren 1 ml MPM ohne FCS während einer Minute hinzugegeben. Weitere zwei ml folgten in zwei min. Die letzten 12 ml wurden vorsichtig im Verlauf von 12 min. unter leichtem Mischen dazugegeben. Diese vorsichtige Prozedur ist notwendig, da die Zellmembranen durch das Polyethyleneglycoll sehr fragil gemacht wurden, mithin die Zellen also sehr leicht lysieren können.

Nach Zentrifugation (250 x g, 10 min.) wurden die Zellen in HAT- Medium in einer Dichte von ca. 10^6 Zellen/ml in vier Klonierungsplatten, die je 24 Kavitäten hatten, ausgebracht. Pro Großquadrat dieser Platten wurde 1 ml pipettiert. Bei der ersten Fusion wurde ein Teil der fusionierten Zellen mit einem "Feeder Layer" von 10^6 Milzzellen/ml, die wie die fusionierten Milzzellen vorbereitet wurden, (3) ausplattiert.

Nach vier Tagen wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, indem etwa 0.5 ml pro Kultur abgesaugt und durch ca. 1 ml frisches HAT- Medium ersetzt wurden. Dieser Schritt wurde am Tag 10 nach der Fusion wiederholt, wobei von nun an HT- Medium verwendet wurde. Zu diesem Zeitpunkt konnte man im Allgemeinen schon vereinzelte Zellklone im Vier- bis Sechzehnzellstadium erkennen. Ab diesem Zeitpunkt wurde begonnen, die Kulturüberstände auf das Vorhandensein von Antikörpern einer gewünschten Spezifität hin zu untersuchen.

Hierzu wurde ein ELISA- Test verwendet (siehe dort). Zellklone aus im ELISA positiven Großquadraten wurden, wenn sie mehr als ca. 100 Zellen umfaßten, aus den Klonierungsplatten mit Hilfe von Pasteurpipetten abgesaugt und in 96- Loch Mikrotiterplatten transferiert. Einige Tage später wurden diese Hybridomas erneut auf ihre Antikörperproduktion getestet. Positive Hybridomas wurden in größeren Volumina vermehrt, eingefroren und umgehend kloniert, um ein Uberwachsen der antikörperproduzierenden Zellen durch eventuell vorhandene Nicht-Produzenten zu verhindern.

2.2.3.6 Methodische Details zu den vier Fusionen

Es wurden drei Maus X Maus- Fusionen durchgeführt. Bei der ersten Fusion wurde ein Lebendimpfstoff i. p. verwendet. Das Tier wurde am ersten und am 22. Tag mit je 10^6 lebenden *E. coli*- Bakterien des Stammes A110 intraperitoneal immunisiert. Der acht Wochen alten Maus wurde vor der ersten und unmittelbar vor der zweiten Immunisierung und am Tage der Fusion (drei Tage nach der zweiten Immunisierung) Blut entnommen. Der Antikörper- Titer wurde im indirekten ELISA (2.2.11) bestimmt.

Die Hälfte der fusionierten Milz- Zellen dieses Tieres wurde unter teilweiser Verwendung von normalen Milzzellen als "Feeder Layer" ausplattiert. Nach vier und zehn Tagen wurden Wechsel des Zellkulturmediums durchgeführt und die Anzahl der Hybridzellklone in beiden Vesuchsansätzen miteinander verglichen. Dabei konnte kein Unterschied in der Anzahl der Hybridomas zwischen dem Anteil mit und ohne Milzzell- "Feeder Layer" festgestellt werden. Da ohnehin nur eine von 10^5 bis eine von 10^4 Milzzellen fusioniert werden (88), können mehr als 99% der eingesetzten Zellen als "Feeder Layer" dienen. Dieser Versuch zeigte, daß eine weitere Zugabe von nicht fusionierten Milzzellen keinen Effekt hat. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde daher auf den Einsatz von "Feeder Layers" verzichtet.

Nach allen Fusionen wurden nach dem 10. Tag im Abstand von

zwei Tagen teilweise Mediumwechsel durchgeführt. Dieser Kulturüberstand wurde zum Testen auf Antikörper- Produktion von Hybridoma- Zellkulturen verwendet. Gleichzeitig wurden Antikörper herausverdünnt, die von nicht fusionierten, aber eventuell noch Antikörper produzierenden Milzzellen ins Medium sezerniert wurden. Diese Zellen leben noch einige Tage in Kultur (73) und können dabei noch Antikörper sezernieren, was zu falsch positiven Resultaten bei der Interpretation des ELISA führen kann.

Da nach dieser ersten Fusion in dem einen Kulturgefäß, dessen Uberstand im ELISA positiv reagierte, sechs Zellklone wuchsen, wurden vierzehn Tage nach der Fusion die Zellen einer jeden Kultur mit Weichagar und in Flüssigkultur kloniert. Durch diese Klonierung wird verhindert, daß die Antikörper produzierenden durch andere, nicht produzierende Zellen überwachsen werden. Nach einigen Tagen wurden die verschiedenen Zellklone im ELISA auf interessante Antikörper überprüft.

Weitere Hybridoma- Zellkulturen wurden nach Immunisierung von Tieren mit Membranpräparationen isoliert. Zwei Mäuse wurden mit Detergenz- behandelten Membranvesikeln (2.2.1) subkutan immunisiert. Dabei wurde Freund's inkomplettes Adjuvants verwendet. Dieses Adjuvants besteht aus Paraffinöl und Mannid-Monooleat. Wenn man das Antigen, mit dem man immunisieren möchte, mit diesem Adjuvants mit einem Ultra- Turrax- Mischgerät vermischt und einem Tier die Emulsion, z. B. subkutan injiziert, entsteht ein Depot für das betreffende Antigen, da dieses im Öl eingeschlossen ist und nur allmählich freigesetzt wird (22). Dadurch ist ein langanhaltender antigener Stimulus gegeben, der zu einer verbesserten Immunantwort führt. Um eine möglichst starke Immunantwort zu erhalten, wurden 10 µg (Proteingehalt) der Membranpräparate auf ein Volumen von 200 µl gebracht und mit der gleichen Menge von Freund's inkomplettem Adjuvants so vermischt, daß eine Emulsion entstand und zur subkutanen Immunisierung von zwei Mäusen verwendet. Diese Tiere wurden für das Fusionsexperiment zwei und drei verwendet.

Die aus diesen Fusionen isolierten Hybridoma- Zellklone wurden in Weichagar und in Flüssigkultur kloniert und ausreichend expandiert. Außerdem wurden tiefgekühlte Zellkulturen angelegt.

Zur Isolierung von Ratte X Ratte- Hybridoma- Zellkulturen wurden einem männlichen, vier Monate alten Tier am ersten, 19. und 162. Tag 0.4 mg (Proteingehalt) einer Gesamt- Membranpräparation des Stammes A109 (LPS- Typ O1A1) in 400 µl H_2O mit 400 µl Freund's inkomplettem Adjuvants als Emulsion an mehreren Stellen des Ruckens subkutan injiziert. Blutproben zur Serumgewinnung wurden an den Tagen 76 und 166 entnommen. Diese Serumproben wurden im indirekten ELISA mit Gesamtmembranen als Antigen untersucht. Zur Fusion wurden die Lymphozyten der Milz genau wie die Mäuse- Milzzellen vorbereitet. 1.3 x 10^8 Lymphozyten wurden mit 6 x 10^7 Myelom- Zellen fusioniert und in einer Dichte vo 1.3 x 10^6 Zellen/ml ausplattiert. Nach 14 Tagen waren ca. 500 wachsende Hybridoma- Kulturen zu beobachten. Zur Erkennung von Hybridomas, die monoklonale Antikörper gegen Membran- Antigene des Stammes A109 sezernieren, wurde ein indirekter ELISA verwendet. Als Antigen im ELISA wurden Gesamtmembranen des Stammes A109 verwendet. Als Konjugat wurde dabei ein Präparat benutzt, das mit allen Immunglobulin- Klassen der Ratte reagiert. Die isolierten Hybridoma-Zellkulturen wurden mit der Methylzellulose- Klonierungsmethode kloniert und so expandiert, daß ca. 500 ml Kulturüberstand vorlagen.

2.2.3.7 Zellklonierung

Unter der Klonierung von Zellen versteht man das Aufziehen von Zellklonen, die als Nachkommen einer einzigen Zelle anzusehen sind. Zum Klonieren wurden drei Methoden verwendet:

Maus X Maus- Hybridomas wurden entweder in Weichagar oder in Flüssigkultur kloniert. Zum Klonieren in Weichagar (65) wurde HT- Medium, das 0.5% Bacto- Agar enthielt, verwendet. Dieses wurde aus doppelt konzentriertem HT- Medium herge-

stellt, das auf 41 °C gebracht wurde und mit dem gleichen Volumen geschmolzenen und auf 41 °C abgekühlten 1%en Bacto- Agar vermischt wurde. Petrischalen (90 mm) wurden mit je 10 ml davon gefüllt. Die zu klonierenden Zellen (50, 100 und 1000 Zellen/Hybridoma/Petrischale) wurden in warmem HT- Medium auf Zelldichten von 10, 100 und 1000 Zellen/ml verdünnt. Je ein ml dieser Zellsuspensionen wurde mit je einem ml des 0.5%igen Agar in HT- Medium (41 °C) vermischt und auf die vorbereitete Agar- Grundschicht gegeben. Diese Petrischalen wurden in eine Kunststoffbox mit einem Wassergefäß getan und im Begasungsbrutschrank bei 37 °C inkubiert.

Makroskopisch sichtbare Zellklone waren nach 7- 12 Tagen zu erkennen. Diese Klone wurden mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in 96- Loch- Gewebekulturplatten mit HT- Medium überführt. Es wurden nur solche Klone gepickt, die deutlich entfernt von anderen Klonen waren und die auf der Platte mit der niedrigsten Zellzahl wuchsen. Die Effizienz dieser Klonierungsmethode lag bei den gewählten Bedingungen bei ca. 1- 10%; d.h. die meisten Zellen starben innerhalb der ersten Tage nach der Klonierung ab. Da diese Methode nicht in allen Fällen erfolgreich war, wurden zwei weitere Methoden zur Klonierung benutzt.

Während die Einzelzellen bei der oben beschriebenen Methode im Gel eingeschlossen sind, werden, erreicht man eine Immobilisierung der Zellen bei der Klonierung mit Methylcellulose durch eine starke Erhöhung der Viscosität des Mediums. Bei der Klonierung mit Methylcellulose nach Iscove et al (33) wurden 20 g Methylcellulose (Methocel A4M) mit 450 ml sterilem H_2O bidest in einem 2 l Erlenmeyerkolben zusammengemischt und kurz aufgekocht. Zum Auflösen von Klumpen wurde der Kolben kräftig geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension erneut kurz aufgekocht und unter fließendem Wasser auf ca. 40- 50 °C abgekühlt. Nun wurden 500 ml doppelt konzentriertes HT- Medium hinzugefügt und mit sterilem H_2O bidest auf 1000 ml aufgefüllt. Nach erneutem kräftigen Rühren wurde die Suspension für

zwei bis drei Stunden auf Eis gestellt. Die jetzt recht viscose Lösung wurde in Aliquots zu je 100 ml abgefüllt. Diese Flaschen konnten bei -20 °C unbegrenzt gelagert werden. Zwei Tage vor Gebrauch wurden die Flaschen aufgetaut und bei 4 °C inkubiert. Dadurch wurde ein hoher Hydratisierungsgrad erreicht, der zu einer hohen Viscosität führte.

Zur Klonierung der Ratte X Ratte- Hybidomas wurden je 1.5 ml Zellsuspension (10, 100 und 1000 Zellen) in MPM mit je einem ml 2% Methylcellulose gemischt. Diese Mischung wurde mit Hilfe einer Spritze mit einer 19 G- Kanüle in eine 60 mm Petrischale gegeben und wie bei der Klonierung mit Weichagar inkubiert. Zellkolonien waren nach ca. 10- 14 Tagen makroskopisch zu erkennen. Sie wurden wie Kolonien nach einer Weichagar- Klonierung behandelt.

Für die Klonierung in Flüssigkultur (3) wurden 96 Loch- Mikrotiter- Gewebekulturplatten verwendet. Als feeder layer wurden ca. 2×10^5 Peritoneal- Makrophagen pro Loch in 100 µl eingesetzt. Die zu klonierende Hybridoma- Kultur wurde auf 600 Zellen/ml verdünnt. Nachdem acht Verdünnungen in Zweierschritten durchgeführt wurden, wurden von jeder Verdünnung 100 µl/ Loch in je 12 Löcher der Mikrotiter- Platte zu den Makrophagen gefüllt. Dadurch wurde ein Bereich von 60 Hybridomazellen/Loch bis 0.4 Zellen/ Loch abgedeckt. Nach 10- 14 Tagen wurden Löcher, die wachsende Hybridoma- Kulturen enthielten, auf Antikörper- Produktion getestet. Der positive Klon, der aus dem Loch mit der niedrigsten Einsaat stammt, wurde weiter gezüchtet.

Nach dem Klonieren wurden die Zellen langsam von HT- Medium auf MPM umgestellt. Dazu wurden dem Kulturmedium bei den Passagen steigende Mengen MPM hinzugefügt. Von allen isolierten Hybridoma- Zellinien wurde mindestens 500 ml Kulturüberstand zur weiteren Aufarbeitung erzeugt.

2.2.3.8 Gewinnung von Ascites- Flüssigkeit

Zur Erzeugung von großen Mengen (Milligramm/ml) von monoklonalen Maus- Antikörpern wurden den Versuchstieren Bauchhöhlen-Tumore gesetzt. Hierzu wurden den zu den Myelomzellen isogenen BALB/c- Mäusen 18 und 10 Tage vor dem Inokulieren der Hybridoma- Zellen je 0.5 ml des Mineralöls Pristan i.p. injiziert (31). Dadurch wird die Chance, Plasmacytomas zu erzeugen, wesentlich erhöht (31). Die Hybridoma- Zellen (ca. 10^7) wurden einmal in serumfreiem Medium gewaschen und in 0.5 ml serumfreiem Medium aufgenommen. Die Injektion i.p. erfolgte langsam mit einer 19 G- Nadel, um Scherkräfte, die die Hybridoma- Zellen zerstören könnten, zu vermeiden. Diese vermehrten sich stark, so daß sich Ascites- Tumore (Plasmacytomas) innerhalb von zwei Wochen nach der Injektion der Zellen entwickelten. Die Ascites- Flüssigkeit, die große Mengen (mg/ml) monoklonaler Antikörper enthielt, wurde täglich durch Punktion des Peritoneums gewonnen und nach niedertouriger Zentrifugation (150 x g, 10 min.), um die Zellen zu entfernen, bei -70 °C aufbewahrt.

2.2.4 Affinitätsreinigung von monklonalen Antikörpern

Zur Affinitätsreinigung von monoklonalen Mäuse- Antikörpern aus Zellkulturüberstand und Ascites- Flüssigkeit wurde immobilisiertes Protein A verwendet. Protein A ist ein Zellwandbestandteil von bestimmten Staphylococcus- Stämmen. Es hat die Eigenschaft, eine Reihe von Immunglobulinen, vorzugsweise am F_c -Teil zu binden (51). Die Affinität zu Immunglobulinen der IgG- Klasse von verschiedenen Spezies ist besonders hoch. (46). Diese Bindung kann durch eine Anderung der Ionenstärke oder des pH- Wertes wieder gelöst werden (51).

Zur Reinigung wurde Protein A- Sepharose CL 4B von Pharmacia verwendet. 0.3 g des Materials wurden in 20 ml 25 mM Tris 150 mM NaCl pH 8.0 (TN) eine Stunde bei Raumtemperatur gequollen. Nach dem Entgasen wurde das Säulenmaterial (ca. 1 ml Volumen) in eine Amicon- Säule DC 7x6 gefüllt und mit 100

ml TN gewaschen. Zur Reinigung von antikörperhaltigem Hybridoma- Kulturüberstand wurde dieser mit einer 1 M Tris- Stammlösung pH 8.0 auf 25 mM Tris pH 8.0 gebracht. Die Säule wurde mit einer Flußrate von 20 ml/h geladen. Dabei werden diese Immunglobuline spezifisch an Protein A absorbiert (51), während andere Proteine, die in dem Kulturmedium enthalten sind, die Gelmatrix ungehindert passieren. Anschließend wurde die Säule mit TN gewaschen, bis die Proteinabsorption A_{280} des Durchlaufs die Basislinie wieder erreicht hatte. Die Elution der an Protein A gebundenen Antikörper erfolgte mit 4 M $MgCl_2$ in TN (17) bei einer Flußrate von 4 ml/h. Das Eluat (ca. 5- 10 ml) wurde zweimal gegen 2 Liter TN über Nacht dialysiert und in Aliquots bei -70 °C aufbewahrt. Die Säule wurde bis zum nächsten Gebrauch bei 4 °C in TN mit 0.02% NaN_3 aufbewahrt.

2.2.5 Methode der Immun- Doppeldiffusion

Zur Bestimmung der Antikörper- Subklasse wurde die Gel-Doppeldiffusionsmethode nach Ouchterlony (63) verwendet. Mit dieser Methode lassen sich die serologische Verwandtschaft von verschiedenen Antigenen sowie die Spezifität von Antiseren untersuchen. Lösungen von Antigenen und Antikörpern diffundieren dabei ausgehend von verschiedenen Ladelöchern aufeinander zu. Wo sich im Bereich ihrer Begegnung Äquivalenz ergibt, bildet sich ein Immunpräzipitat, das häufig die Form einer scharfen Linie aufweist. Im vorliegenden Fall wurden Antiseren gegen die einzelnen Antikörper- Subklassen der Maus und der Ratte benutzt, um die Subklasse der jeweiligen monoklonalen Antikörper zu bestimmen.

Dazu wurde eine Agarose- Gel- Platte folgendermaßen angefertigt: Eine 84 x 95 mm große Glasplatte wurde dünn mit etwas geschmolzenem Agarose- Gel bestrichen und getrocknet. Die so vorbeschichtete Glasplatte wurde mit 12 ml geschmolzenem, 50 °C warmem Agarose- Gel beschichtet (1.5 mm Geldicke). Nach dem Erstarren und Abkühlen des Gels auf 4 °C wurde an sieben Stellen der Gel- Platte ein Hexagon mit Zentralloch ausgestanzt, wobei der Lochdurchmesser 2.5 mm und der Hexagondurch-

messer 15 mm betrug. In das Zentralloch jedes Hexagons wurden 5 µl eines Hybridoma- Zellkulturüberstandes und in die sechs radialen Löcher je 5 µl der Antiseren gegen die verschiedenen Antikörper- Subklassen pipettiert. Zur Untersuchung von eventuellen Isotyp- Unterschieden wurde das Verfahren umgekehrt angewendet; d.h. es wurde ein Subklassen- spezifisches Antiserum ins Zentralloch und die monoklonalen Antikörper einer Subklasse in die radialen Löcher gegeben. Die so geladenen Gel- Platten wurden über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Zur besseren Ausbildung von Präzipitationslinien wurde das Gel mehrere Tage bei 4 °C inkubiert.

Zur Färbung wurden die Gele mit einem nassen Filterpapier bedeckt, eine Schicht aus fünf saugfähigen Papierhandtüchern aufgelegt und mit einem Druck von 10 g/cm^2 15 min. lang gepresst. Danach wurden die Gele zweimal 15 min. in Waschlösung und einmal 15 min. in H_2O bidest unter leichtem Schütteln gewaschen. Nach dem Trocknen der Gele bei 60 °C wurden sie für 30 min. im Färber angefärbt und anschließend im Entfärber entfärbt, bis die Hintergrundfarbe angemessen blaß war. Die Gele wurden nun erneut bei 60 °C getrocknet.

2.2.6 Mikro- Agglutination

Für die Agglutination von Bakterien in einer Mikroversion wurden Übernacht- Kulturen von Bakterien in L- Broth abzentrifugiert, in dem Ausgangsvolumen PBS resuspendiert und zwei Stunden bei 100 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 0.5% und einige Tropfen Safraninlösung (Merck; für Gram- Färbung) bis zum Eintreten einer Rotfärbung hinzugegeben. Der Agglutinationstest wurde in Mikrotiter- Platten mit U- förmigem Boden durchgeführt. Dazu wurden 50 µl einer Bakteriensuspension mit 50 µl einer Antiserumverdünnung in je einer Vertiefung der 96- Loch- Mikrotiterplatte zusammengegeben und durch leichtes Schütteln miteinander vermischt. Die Platte wurde sodann abgedeckt und über Nacht bei 50 °C ohne Schütteln inkubiert.

Wenn am nächsten Tag in der Aufsicht auf die Platte am Boden der U- förmigen Platte ein roter Punkt zu sehen war, so hatte das Antiserum die verwendeten Bakterien nicht agglutiniert; sie waren frei sedimentiert. War kein roter Punkt zu sehen, so hatte das Antiserum die Bakterien agglutiniert, so daß sie nicht sedimentieren konnten.

Diese Methode wurde der Arbeitsgruppe dankenswerterweise vor einer Veröffentlichung von Dr. Loek van Alphen, Amsterdam, Niederlande, überlassen.

2.2.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Ermittlung der immunologischen Zugänglichkeit von bakteriellen Antigenen wurde ein indirekter Immunfluoreszenz-Test nach Johnson et al. (36) durchgeführt. Dazu wurden Bakterien in L- Broth über Nacht gezüchtet und am nächsten Morgen nach einer Zentrifugation (10.000 x g, 5 min.) in einem Drittel des Ursprungsvolumens PBS resuspendiert. Je 10 µl davon wurde auf Objektträger gegeben. Die Bakterien wurden durch vorsichtiges Trocknen über der Sparflamme eines Bunsenbrenners fixiert. Die zu testenden Antiseren wurden in Tropfen zu 50 µl auf die hitzefixierten Bakterien gegeben und in einer feuchten Kammer bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Die Objektträger wurden durch 5- maliges Eintauchen in PBS von nicht gebundenen Antikörpern befreit und mit einer 1: 40 Verdünnung eines FITC (5- Isocyanatofluorescein)- konjugierten Antiserums mit Bindungsspezifität für den ersten Antikörper für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 5- maligem Eintauchen der Objektträger in PBS und einmaligem Waschen mit H_2O bidest wurden die Präparate mit PBS, dem 50% Glycerin zugesetzt war, bedeckt und mit Ölimmersion unter dem Mikroskop untersucht. Die Fluoreszenz der Präparate wurden bei 495 nm angeregt; das emittierte Licht hatte eine Wellenlänge von 525 nm. Es wurde darauf geachtet, daß die Präparate nicht austrockneten, da sonst Artefakte zu beobachten waren. Die Präparate wurden in einem Zeiss Mikroskop, Typ Standart RA im Phasenkontrast mit 1000- facher Vergrößerung ausgewertet.

2.2.8 Immunogold- Elektronenmikroskopie

Als weitere Methode zur Erkennung von antigenen Determinanten der Bakterienoberfläche wurde eine elektronenmikroskopische Methode unter Verwendung von Protein A- Gold- Konjugaten eingesetzt (16). Hierzu wurden E. coli- Bakterien über Nacht in L- Broth gezogen. 100 µl von solchen Kulturen wurden zwei min. bei 15.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl Antiserum, das in PBSG verdünnt war, resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min. mit leichtem Schütteln bei Zimmertemperatur wurden die Bakterien durch dreimalige Zentrifugation gewaschen. Um auf der Bakterienoberfläche gebundene Antikörper zu markieren, wurden die Bakterien in 50 µl eines Protein A- Gold- Konjugates inkubiert. Dieses Konjugat bestand aus 9.6 nm großen Partikeln von kolloidalem Gold, die an Staphylococcus aureus- Protein A gekoppelt waren. Zur Verwendung wurde es 1:10 in PBSG verdünnt. Nach einer Inkubation von 30 min. wurden die Bakterien durch viermaliges Waschen mit PBSG von nicht gebundenem Protein A- Gold- Konjugat befreit. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Bakterien einmal mit TBT gewaschen und anschließend in 50 µl TBT resuspendiert.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden von Marion Kamke und Giovanna Morelli durchgeführt. Dabei wurde ein Philips Elektronenmikroskop EM 301 verwendet. Die Proben wurden mit 1% wässriger Uranylacetat- Lösung für 30 s kontrastiert.

2.2.9. Western Blotting und Immunfärbung

Für den elektrophoretischen Transfer auf Nitrocellulose (Western Blot) (79) wurden die unfixierten SDS- Polyacrylamid- Gele sofort nach Beendigung der SDS- PAGE luftblasenfrei auf eine Nitrocellulosemembran, Typ BA 85, gelegt. Auf beide Seiten dieses "Sandwich" wurden je zwei Lagen Whatman Nr. 3MM- Papier gelegt. Auf die Seite des SDS- Polyacrylamid- Gels wurde eine Schicht Haushaltsschwamm (3M) gelegt. Diese Konstruk-

tion wurde zwischen zwei gelochte Kunststoffplatten eingespannt und in die Elektrophorese- Kammer TE42 von Hoefer Scientific gebracht. Für den elektrophoretischen Transfer von Membranproteinen wurde ein Tris/Glycinpuffer (20/200 mM) verwendet. Der Transfer wurde bei 6 V/cm für eine Stunde bei Raumtemparatur durchgeführt. Zur Transferierung von gereinigtem LPS wurde ein 25 mM Phosphatpuffer, pH 7.5, verwendet. Die sonstigen Transfer-Bedingungen entsprachen denen des Proteintransfers.

Nach der Transferierung wurde die Nitrocellulose- Membran in PBS/Tween bzw PBS gelegt, das 1% BSA enthielt, um proteinbindende Stellen auf der Membran abzusättigen. Nach 45 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran mit PBS bzw. PBS/Tween abgespült und getrocknet. Die immunologischen Eigenschaften blieben für mindestend sechs Monate erhalten.

Für die Immunfärbung des Blots wurde die Methode von Blake et al. (5) benutzt. Alle Inkubationen mit Antiseren wurden in BSA- haltigem Puffer durchgeführt. Die Inkubation mit dem ersten Antiserum wurde für 90 min. bei Raumtemparatur mit leichtem Schütteln durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS bzw. PBS/Tween wurde der Blot mit einem Konjugat inkubiert. Das Konjugat bestand aus einem Antiserum gegen die Spezies des ersten Antiserums. An dieses zweite Antiserum war alkalische Phosphatase gekoppelt. Es wurde 1: 500 oder 1:1000 verdünnt. Nach Ende der Inkubation wurde der Blot fünf Mal mit PBS bzw. PBS/Tween und einmal mit Veronal- Acetat- Puffer (37 °C) gewaschen. Nach Zugabe der Färbelösung wurde der Blot bei 37 °C mit Schütteln inkubiert. Nach ca. 10 min waren die Banden, an denen eine Antikörper-Antigenreaktion stattgefunden hatte, als blaue Färbung sichtbar.

2.2.10 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde die photometrische Methode von Spector (77) benutzt. Diese Methode gibt lineare Resultate in

einem Bereich von 0.5- 50 µg. 0.1 ml der Probe wurden mit 2 ml Coomassie- Farbreagenz gemischt. Nach 2 min. bis 1 h wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Proteinstandart wurde BSA verwendet.

2.2.11 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Zum Nachweis von Hybridomas, die monoklonale Antikörper gesuchter Spezifität produzieren, wurde ein indirekter ELISA nach Voller (79) verwendet. Abb. 5 zeigt das Prinzip dieses Tests, bei dem Antigen an eine Kunststoffoberfläche absorbiert wird, an das spezifische Antikörper binden können, die mit Enzym- gekoppelten Anti- Antikörper- Konjugaten anhand einer Enzymreaktion erkannt werden können. Die ELISA- Platten wurden über Nacht bei 37 °C mit Antigen inkubiert. Jede Kavität der Mikrotiterplatte wurde mit 150 µl Antigen- Lösung gefüllt. Die Platten wurden dabei abgedeckt, um ein Austrocknen der Antigen- Lösungen zu verhindern. Als Antigen wurden Gesamtmembranen von E. coli- Stämmen 1: 5.000 in Beschichtungspuffer verdünnt. Diese Verdünnung entspricht einer Proteinkonzentration von ca. 2- 10 µg/ml und hatte sich in Vorversuchen als günstig herausgestellt. Für ELISA- Experimente, bei denen LPS- spezifische Hybridomas erkannt werden sollten, wurde LPS in einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS/$MgCl_2$ zum Beschichten der Platten benutzt.

Zu Beginn des Tests wurden die Kavitäten der ELISA- Platten dreimal mit PBS/Tween gewaschen und mit je 100 µl Überstand der Hybridoma- Zellkulturen gefüllt, der mit 50 µl PBS/Tween verdünnt war. Nach einer 90 minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die ELISA- Platten dreimal gewaschen und mit je 150 µl/Kavität einer Verdünnung eines Peroxidase- Konjugats in PBS/BSA/Tween zum Nachweis von an das Antigen gebundenen Antikörpern gefüllt. Nach 90 min. wurden die ELISA- Platten fünfmal gewaschen und mit ELISA- Substrat gefüllt. Nach 30 min. wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 25 µl H_2SO_4 gestoppt. Die Platten wurden in einem Mikro- ELISA autoreader

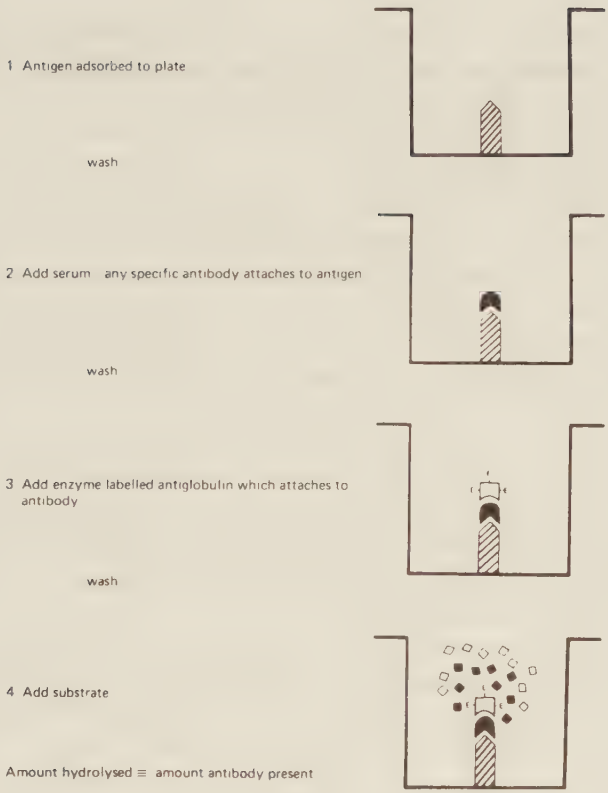

Abb. 5: Schematische Darstellung des Antikörpernachweises mit Hilfe des indirekten ELISA (aus 84).

bei 490 nm ausgewertet.

Auf jeder Platte befanden sich Kontrollen, um die Spezifität des Tests verfolgen zu können. Als Negativkontrolle wurde eine Kavität mit Antigen beschichtet und nur mit dem Konjugat inkubiert. Dadurch konnten Nebenreaktionen des Konjugats festgestellt werden. Als Positivkontrolle wurde eine Verdünnung eines Immunserums verwendet. Hybridoma- Kulturen, deren Über-

stände eine A_{490} von mehr als 0.3 relativ zur Negativkontrolle hatten, wurden als positiv bewertet und weiter gezüchtet.

2.2.12 Konjugatherstellung

Zur Herstellung eines Antikörper- Konjugates mit alkalischer Phosphatase wurde ein anti- Peroxidase- Serum (Sigma) an alkalische Phosphatase gekoppelt. Dazu wurde die Methode, die in der Arbeitsanleitung Nr. 2 M.582.683.B von Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, beschrieben wurde, verwendet. Im Einzelnen wurden 2.4 ml des Phosphatpuffers (50 mM, pH 7.2) mit 10.000 U alkalischer Phosphatase und 20 µl 25%gem Glutaraldehyd gemischt und 50 min. bei 25 °C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl des Anti- Peroxidase- Serums (fraktioniert, Proteingehalt 37.6 mg/ml) und 300 µl Phosphatpuffers wurden die Reagenzien miteinander vermischt und weitere 75 min. bei 25 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend einer Gelfiltraomponenten abgetrennt werden. Zum Eluieren wurde der angegebene Tris- Puffer verwendet. Die Laufgeschwindigkeit betrug 12 ml/h. Proteinhaltige Fraktionen wurden mit Hilfe eines UV- Photometers erkannt. Die ersten proteinhaltigen 20 Fraktionen zu je 1 ml wurden als Konjugat verwendet

2.2.13 Adsorption von O- Antiseren

O- Antiseren, die gegen einen E. coli- Stamm mit einem definierten O- Serotyp hergestellt werden, zeigen häufig kreuzreagierende Aktivität mit Bakterien anderer O- Serotypen (60). Um solche Seren monospezifisch zu machen, müssen sie mit kreuzreagierenden Bakterien adsorbiert werden (18). Die Adsorption wurde folgendermaßen durchgeführt: Für je 500 µl eines zu adsorbierenden Serums wurden 100 ml einer stationären über- Nacht- Kultur von E. coli- Bakterien verwendet. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (10 min. 4 °C, 14.000 x g). Nach

einmaligem Waschen im Ausgangsvolumen PBS wurden die Bakterien wieder abzentrifugiert und in 1/10 des Ausgangsvolumens aufgenommen. Nach hochtouriger Zentrifugation (49.000 x g, 15 min., 4 °C) wurde die zu adsorbierende und 1: 20 vorverdünnte Serumprobe auf das Pellet gegeben, das darin resuspendiert wurde. Nach zweistundiger Inkubation bei 37 °C wurde wiederum zentrifugiert (49.000 x g, 15 min., 4 °C). Der Überstand wurde in neue Zentrifugenbecher getan und erneut zentrifugiert, um eventuelle Membranvesikel zu entfernen (49.000 x g, 60 min., 4 °C). Der Überstand (adsorbiertes Serum) entsprach einer 1:40 Verdünnung des Serums und wurde in Aliquots aufgeteilt und bei -70 °C gelagert.

2.2.14 Inhibitions- ELISA

Um die Bindung von Antikörpern an das an der festen Phase (ELISA- Platte) adsorbierte Antigen durch Polysaccharide zu verhindern, wurden 40 µl- Aliquots von Serumverdünnungen in PBS/BSA/Tween mit 10 µl eines Inhibitor- Stoffes in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit Rundboden gemischt. Dieses Gemisch wurde daraufhin in die leeren Kavitäten einer ELISA-Platte gegeben, die mit Antigen beschichtet und drei mal mit PBS/Tween gewaschen worden war. Nach 90 min. Inkubation bei 37 °C wurde die ELISA- Platte drei mal mit PBS/Tween gewaschen und mit einer Verdünnung eines Konjugates (in PBS/BSA/Tween) gefüllt. Nach 90 min. Inkubation bei 37 °C wurden die Kavitäten der Plate fünf mal gewaschen und mit ELISA- Substrat gefüllt. Nach 30 min. wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 25 µl H_2SO_4 gestoppt. Die Platten wurden in einem Mikro-ELISA autoreader bei 490 nm ausgewertet.

3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

3.1 Immunisierung von Versuchstieren und Isolierung von monoklonalen Antikörpern.

Innerhalb einer Sammlung von Escherichia coli- Humanisolaten, die mit normalen serologischen Methoden dem O- Serotyp O1 zugeordnet worden waren, konnten bei einer Analyse des Lipopolysaccharids dieser Bakterien mit Hilfe einer SDS- PAGE vier verschiedene Molekülspezies festgestellt werden (44, M. Achtman, pers. Mitteilung). Abb. 6 zeigt ein SDS- Polyacrylamid-Gel, auf dem die verschiedenen LPS- Spezies innerhalb des O1- Serotyps dargestellt sind. Im unteren Bereich des Gels ist die Lipid A- Core Region zu sehen. Die mit Pos. I bis III gekennzeichneten Bereiche zeigen die Gruppen von Molekülen, die zunehmenden Längen der Oligosaccharid- Wiederholungseinheiten entsprechen. Die Spuren 1 und 2 zeigen die beiden LPS- Typen, die bei den Bakterien dieser Stammsammlung am häufigsten anzutreffen waren. Der eine Typ, der mit O1A1 bezeichnet wird (Spur 1), läuft stets als eine Serie von Doppelbanden, der andere Typ, O1A (Spur 2), als eine Serie von Einzelbanden, parallel zu der oberen Bande des Doppelbanden- Musters. Die Zuschreibung der Isolate zu einem dieser beiden LPS- Muster korrellierte mit der Zugehörigkeit zu einem von zwei Haupt- Klonen innerhalb der O1- E. coli. Neben O1A und O1A1 wurden noch zwei andere LPS- Typen innerhalb der als O1- typisierten Bakterien gefunden. Sie verhalten sich bei der SDS- PAGE anders als O1A1 und O1A LPS und wurden als O1B (Spur 4) und O1C (Spur 3) bezeichnet.

Um vergleichende Untersuchungen innerhalb der Gruppe der O1- E. coli durchführen zu können, wurden Kaninchen- Antiseren unter Verwendung von Bakterienstämmen des LPS- Typs O1A1 und O1A hergestellt. Außerdem wurden mit diesen Seren Kreuzreaktionen zwischen dem O1- Serotyp und anderen O- Serotypen untersucht (3.4).

Abb. 6: SDS- Polyacrylamid- Gel der vier verschiedenen LPS-Typen innerhalb des Serotyps O1. Das Gel wurde mit $AgNO_3$ gefärbt. Spur 1: O1A1 LPS (Stamm A109), Spur 2: O1A LPS (Stamm A110), Spur 3: O1C LPS (Stamm A47), Spur 4: O1B LPS (Stamm A206).

Außerdem wurden für vergleichende serologische Untersuchungen von Oberflächenantigenen von E. coli des O1- und anderer O- Serotypen monoklonale Antikörper isoliert. Diese entstammten drei Maus X Maus- Fusionen und einer Ratte X Ratte- Fusion.

Hierzu wurden 3 Mäuse und eine Ratte immunisiert. Die Milz-Lymphozyten der immunisierten Tiere wurden mit entsprechenden Myelomzellen verschmolzen, wie in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Das Immunserum der ersten Maus, die mit einem Lebendimpfstoff immunisiert wurde, hatte einen recht niedrigen Titer im indirekten ELISA. Hierbei wurden als Antigen O1A LPS und als Konjugat ein Präparat benutzt, das mit allen Immunglobulin- Klassen der Maus reagierte und an das Meerettich- Peroxidase gekoppelt war. Abb. 7 zeigt den Anstieg des Antikörpertiters im Verlauf der Immunisierung. Bei dieser Art der Immunisierung war die Aktivität des Immunserums gegen O1- LPS bereits bei einer Verdünnung von 1: 500 sehr weit abgesunken ist. Mit anderen Immunisierungsmethoden lassen sich erheblich höhere Serumantikörper- Titer im ELISA erreichen. Solche Immunisierungen garantieren eine höhere Ausbeute an Hybridomas, die monoklonale Antikörpern der gewünschten Spezifität produzieren. Bei dieser ersten Fusion wurde der O1- LPS spezifische Klon 2C9 isoliert.

In Abb. 8 sind mikroskopische Aufnahmen von einem Weichagar Klon sowie von Maus- Milzzellen, Myelomzellen und Hybridomas dargestellt. Morphologisch sind Myelomzellen kaum von Hybridoma- Zellinien zu unterscheiden.

Fusions-Experiment	1	2	3	4
Spezies	Maus	Maus	Maus	Ratte
Immunisierung	10^6 Bakterien A110 i.p.	ß- Glucosid behandelte Membranen v.A110 subcutan	Desoxycholat-behandelte Membranen v.A110 subcutan	Gesamt-Membranen v.A109 subcutan
mit Adjuvants	nein	ja	ja	ja
(Tag)	(1,25)	(1,25)	(1,25)	(1,19,162)
LPS- Typ des Immunogens	O1A	O1A	O1A	O1A1
Blutproben (Tag)	(1,22,25)	(1,25)	(1,25)	(76,166)
ELISA- Titer v. Immunserum (Antigen)	<1:1.000 (O1A- LPS)	>1:10.000 (A110- Membr.)	>1:10.000 (A110- Membr.)	>1:10.000 (A109-Membr.)
Myelom-Zellinie (Species)	P3-X (Maus)	P3-X (Maus)	P3-X (Maus)	IR983F (Ratte)
Fusionstag	25	28	28	166
Anzahl der Milz-Lymphozyten	1.2×10^8	1.5×10^8	1.5×10^8	1.3×10^8
Anzahl der Myelomzellen	7×10^6	7.2×10^7	7.2×10^7	6×10^7
Milzzell-"Feeder Layer"	ja	nein	nein	nein

Tabelle 2, Fortsetzung:

Anzahl von Hybridoma-Kulturen	ca. 1.000	ca. 1.000	ca. 1.000	ca. 500
isclierte LPS- spez. Hybridomas	2G9	7721 7724	8318 8407 8409 8416 8507	3218 3416
andere Hybridomas		7306	8423	

Tabelle 2. Übersicht über die Immunisierungen von Mäusen und Ratten sowie über deren Immunantwort und die Zellfusionsbedingungen zur Isolierung von monoklonalen Antikörpern.

Bei den Maus X Maus- Hybridomas war im Gegensatz zu den Ratte X Ratte- Hybridomas stets eine Proliferation der fusionierten, wachsenden Zellen zu beobachten, die sich auf die Nähe der Ursprungszelle beschränkte. Die Milzzellen waren leicht von den Myelomzellen zu unterscheiden, da sie weniger als halb so groß sind.

Links unten in Abb. 8 ist ein Weich- agar- Klon dargestellt. Das Wachstum dieser Weich- agar- Klone war unter den gewählten Bedingungen wesentlich langsamer als das Wachstum der Zellinien in Flüssig- Kulturen.

Um die Antikörperbildung gegen Nicht- LPS- Antigene zu verstärken und damit die Chance zu verbessern, monoklonale Antikörper entsprechender Spezifität zu erhalten, wurden für die nächsten zwei Fusionen zwei acht Wochen alte Mäuse am ersten und 25. Tag mit Membranpräparaten des Stammes A110 immuni-

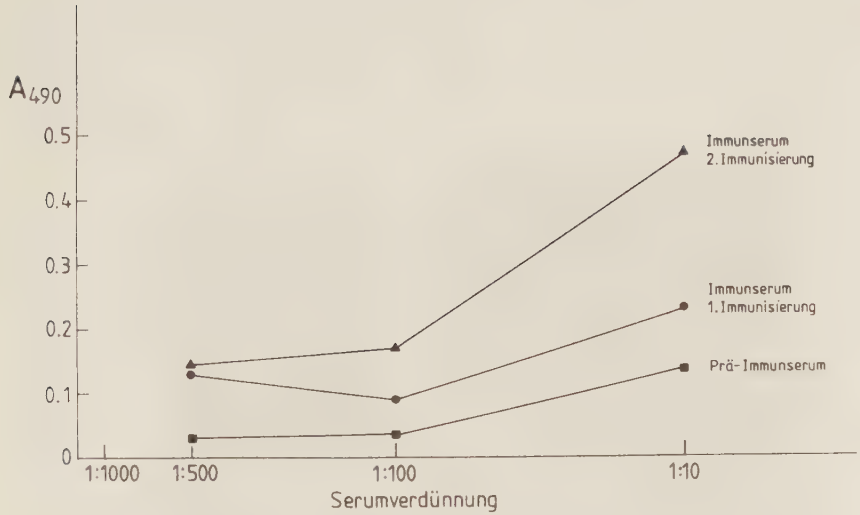

Abb. 7: Immunantwort einer Maus auf intraperitoneale Immunisierung mit lebenden O1A- E. coli- Bakterien. Zur Mesung des Antikörpertiters wurde ein indirekter ELISA- Test mit gereinigtem O1A- LPS als Antigen eingesetzt.

siert. Die Membranpräparate wurden durch Detergenz- Extraktionen mit ß- Glucosid bzw. Natrium- Desoxicholat teilweise von LPS befreit, um Proteine der äußeren Membran immunologisch leichter zugänglich zu machen. Die Extraktionsbedingungen wurden so gewählt, daß die Hauptproteine der äußeren Membran in den Membranvesikeln verblieben (nicht gezeigt). Eine Maus (Fusion 2) wurde mit Glucosid-, die andere (Fusion 3) mit Desoxicholat- behandelten Membranen immunisiert.

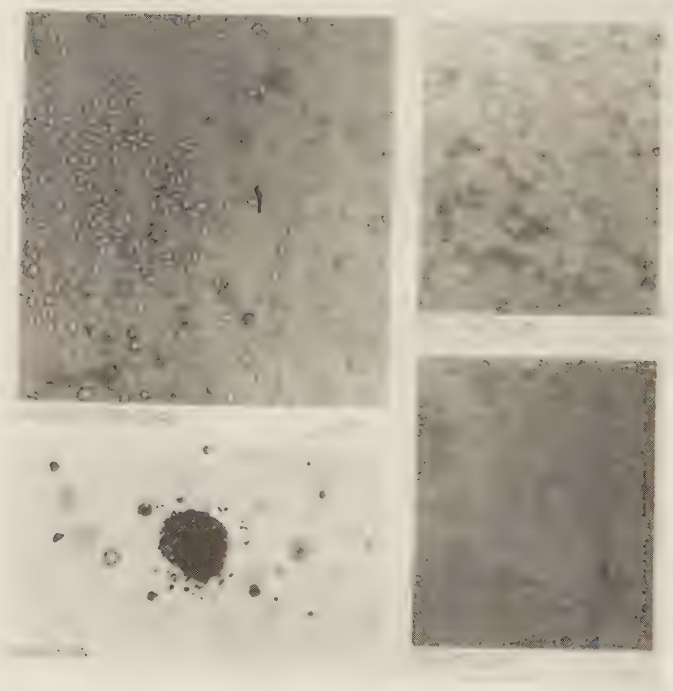

Abb. 8: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Hybridzellen, Myelomzellen, Maus- Milzzellen und einem Weich- agar- Klon.

Am 25. Tag nach der ersten Immunisierung wurden die Mäuse

erneut immunisiert. Die dabei genommenen Immunseren waren noch bei einer Verdünnung von 1: 20.000 im ELISA positiv. Es wurde dabei das gleiche Konjugat wie bei der ersten Fusion verwendet. Die unterschiedliche Detergenzbehandlung der als Antigen eingesetzten Membranpräparate bewirkte keinen Unterschied in der Immunreaktion der Tiere, der bei dem verwendeten ELISA festgestellt werden konnte.

Aus Fusionen mit den Milz- Lymphozyten dieser beiden Tiere wurden neun stabile Hybridoma- Klone isoliert, die Antikörper gegen Bakterien- Membranen des Stammes A110 produzieren. Von diesen neun Hybridoma- Zellinien produzierten sieben Antikörper, die mit dem O1A LPS bei einem ELISA mit diesem gereinigten LPS als Antigen reagierten. Die Untersuchung der Antigen-Spezifität der beiden anderen Hybridomas ist an anderer Stelle beschrieben (siehe dazu 3.3.1). Alle Maus X Maus- Hybridomas wurden entweder in Weichagar oder in Flüssigkultur kloniert. Zur Erzeugung von größeren Mengen von Maus X Maus- monoklonalen Antikörpern wurden Ascitesflüssigkeit gewonnen.

Ein allgemeines Problem war, daß eine Reihe von Maus X Maus- Hybridoma- Zellkulturen die Produktion von spezifischen monoklonalen Antikörpern wenige Tage nach der Fusion einstellte und daher verworfen werden mußte. Aus den drei Maus X Maus-Fusionsexperimenten konnten insgesamt acht stabile Hybridoma-Zellkulturen isoliert werden, die monoklonale O1- LPS- spezifische Antikörper produzierten.

Zur Durchführung von vergeichenden Untersuchungen zwischen dem O1A LPS und dem O1A1 LPS, das bei der SDS- PAGE stets als eine Serie von Doppelbanden läuft (siehe Abb. 2), wurden für die vierte Fusion Membranen eines O1A1- Stammes verwendet.

Für diese Fusion wurden Ratte X Ratte- Hybridomas isoliert, da diese stabiler als Maus X Maus- Hybridomas sind (11). Ü32 Zur Immunisierung wurde eine männliche, vier Monate alte Ratte des Stammes LOU/M verwendet. Sie wurde mit Gesamtmembranen des

E. coli- Stammes A109 (LPS- Typ O1A1) immunisiert. Die beiden an den Tagen 76 (vor der zweiten Immunisierung) und 166 (vor der dritten Immunisierung) genommenen Immunserumproben reagierten in einem ELISA mit Gesamt- Membranen des Stammes A109 noch bei einer Verdünnung von 1: 32.000. Es war kein Anstieg des Titers zwischen der ersten und der zweiten Probe festzustellen.

Die Fusion der Milzzellen mit den Zellen der Myelom- Zellinie IR983F wurde am 166. Tag nach Beginn der Immunisierung durchgeführt. Aus dieser Fusion, bei der ca. ein Drittel der Milz verwendet wurde, konnten zwei Hybridomas isoliert werden, die Antikörper gegen A109- Membranen produzierten: 3416 und 3218. Beide Zellinien wurden mit Hilfe der Methylcellulose-Klonierungsmethode kloniert.

3.2 Immunologische und biochemische Charakterisierung der monoklonalen Antikörper.

3.2.1 Immunologische Charakterisierung der isolierten monoklonalen Antikörper.

Für viele Zwecke ist es notwendig, die Subklasse der monoklonalen Antikörper zu bestimmen, die man isoliert hat. Dies gilt z.B. für Experimente, bei denen Protein A verwendet werden soll, da dieses Protein A nur bestimmte Antikörper- Suklassen bindet. Weiterhin können solche Untersuchungen Aufschluß über immunologische Verwandtschaften zwischen verschiedenen monoklonalen Antikörpern geben.

Der Isotyp der monoklonalen Antikörper wurde mit Hilfe einer Immun- Doppeldiffusionsmethode bestimmt. Abb. 9 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuchs. Die peripheren Ladelöcher wurden mit je 5 µl der Antiseren gegen die einzelnen Mäuse-Antikörper- Subklassen geladen. Das zentrale Ladeloch wurde mit antikörperhaltigem Kulturüberstand von Maus- Hybridoma-Zellkulturen bzw. mit 5 µl normalem Mäuseserum als Kontrolle

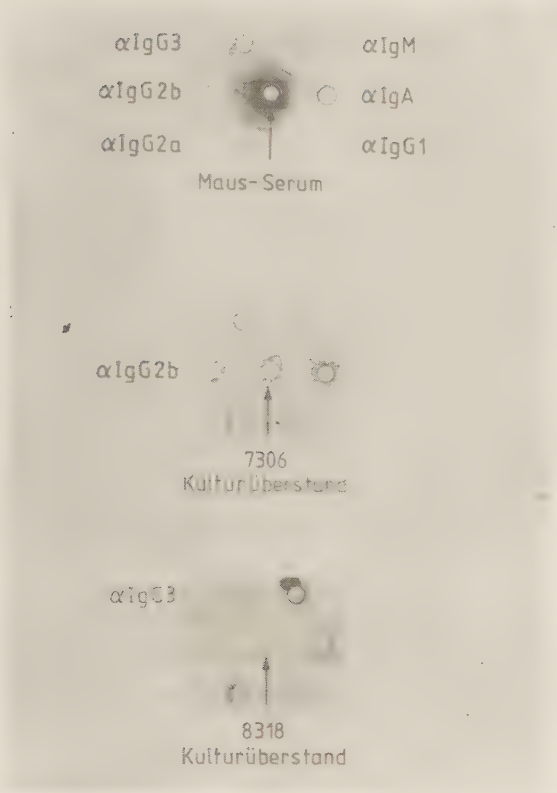

Abb. 9: Immun- Doppeldiffusion nach Ouchterlony (63). Im Zentralloch wurde antikörperhaltiger Kulturüberstand von Mäuse- Hybridoma- Zellen bzw. Mäuseserum geladen; die peripheren Löcher wurden mit Antiseren gegen Antikörper- Subklassen (Anti- IgM bis Anti- IgG3) geladen.

geladen. Die Untersuchung der Hybridoma- Kulturüberstände 7306 und 8318 ergab nur je eine einzige Präzipitationslinie; 7306- Kulturüberstand präzipitierte mit dem gegen die Subklasse IgG2b gerichteten Antiserum. Der Kulturüberstand der Zelli-

nie 8318 ergab eine Präzipitationslinie mit dem Antiserum gegen die Immunglobulin- Subklasse IgG3. Bei der Untersuchung von Kulturüberstand von nicht klonierten Hybridoma- Zellen war gelegentlich mehr als eine Präzipitationslinie zu erkennen, was auf das Vorhandensein von mehr als einem Antikörper produzierenden Hybridoma- Klon hindeutet und die Notwendigkeit der umgehenden Klonierung von neu isolierten Hybridoma- Zellinien unterstreicht (nicht gezeigt). Alle Maus- Immunglobulin- Subklassen- spezifischen Antiseren enthielten ausreichende Mengen von spezifischen Antikörpern, um die eine Präzipitationsreaktion gegen Mäuseserum hervorzurufen. Die Spezifität der verwendeten Antiseren wurde dadurch gezeigt, daß sich die Präzipitationslinien klar überschnitten, was bei einer Kreuzreaktivität zwischen den einzelnen Antiseren nicht der Fall gewesen wäre (63). Mit der gleichen Methode wurde auch der Typ der leichten Ketten der isolierten Mäuse- Hybridomas untersucht.

Monoklonaler Antikörper	Spezies	Spezifizität	Immunglobulin- Subklasse	Typ der leichten Ketten
2G9	Maus	O1 LPS	IgG3	kappa
7721	Maus	O1 LPS	IgG3	kappa
7724	Maus	O1 LPS	IgG3	kappa
8407	Maus	O1 LPS	IgG3	kappa
8409	Maus	O1 LPS	IgG3	kappa
8416	Maus	O1 LPS	IgG3	kappa
8318	Maus	O1 LPS	IgG3	kappa
8507	Maus	O1 LPS	IgA	?
7306	Maus	OmpA	IgG2b	?
8423	Maus	OmpA	IgG2a	kappa
3218	Ratte	O1 LPS	IgG2b	?
3416	Ratte	O1 LPS	IgM	?

Tabelle 3: Immunologische Charakterisierung der isolierten monoklonalen Antikörper.

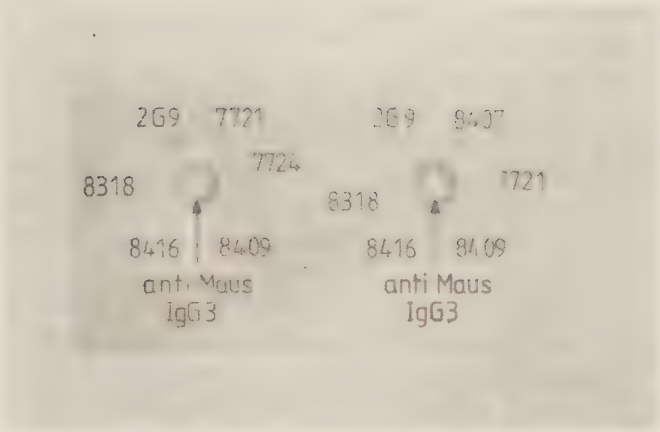

Abb. 10: Immun- Doppeldiffusion. In den Zentrallöchern wurde Anti- Maus- IgG3 Serum pipettiert; die peripheren Löcher wurden mit Kulturüberstand der sieben IgG3- Hybridomas geladen.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 3 dargestellt. In dieser Tabelle ist bereits die Antigenspezifität der monoklonalen Antikörper angegeben, die im Folgenden näher erläutert werden wird.

In Abb. 10 ist eine Immun- Doppeldiffusion dargestellt, in der die sieben isolierten IgG3- monoklonalen Antikörper auf ihre immunologische Verwandtschaft hin untersucht wurden. Alle Antikörper ergaben identische, sich nicht kreuzende, Präzipitationslinien, waren also mit dieser Methode nicht zu unterscheiden.

3.2.2 Biochemische Charakterisierung der isolierten monoklonalen Antikörper.

Zur biochemischen Charakterisierung der Antikörper wurden affinitätschromatographisch gereinigte Immunglobuline verwendet. Dieser Reinigungsschritt war erforderlich, da die Antikörper im Zellkulturmedium mit einer Konzentration von ca. 5-20 µg/ml (6) fast als Kontamination zu bezeichnen sind. Dieses Medium enthält u.a. 10% FCS und damit eine Reihe von anderen Proteinen als Immunglobulinen. Durch Proteaseaktivität im Kulturmedium können die Antikörper nach Lagerung in Medium zerstört werden. Ascites- Flüssigkeit enthält ebenfalls eine Reihe von kontaminierenden Proteinen. Die Kulturüberstände bzw. die Ascites- Flüssigkeit wurden zur Reinigung über eine Protein A- Sepharose- Säule gepumpt. Die nicht an Protein A bindenden Proteine wurden mit Puffer ausgewaschen und das gebundene IgG anschließend mit 4M $MgCl_2$ eluiert. Das typische Elutionsprofil einer Affinitätschromatografie von monoklonalen Antikörpern mit Protein A- Sepharose für Immunglobuline der Klasse IgG3 ist in Abb. 11 wiedergegeben. In diesem Experiment wurden 500 ml Kulturüberstand der Maus- Hybridomazellinie 8409 gereinigt. Die so gereinigten und dialysierten Antikörper wurden bei -70 °C aufbewahrt. Der Proteingehalt dieser Präparate betrug ca. 0.2 mg/ml.

Der Maus X Maus monoklonale Antikörper 8507 (IgA) und die beiden Ratte X Ratte- monoklonalen Antikörper 3218 (IgG2b) und 3416 (IgM) wurden nicht gereinigt.

Zur Untersuchung der gereinigten monoklonalen Antikörper mit Hilfe der SDS- PAGE wurde ein 10%iges Gel verwendet. Es wurden je ca. 10 µg Protein geladen. Alle Proben wurden vor dem Auftragen durch kurzes Kochen in Probenpuffer denaturiert. Durch diesen Schritt werden die leichten und die schweren Immunglobulinketten des IgG voneinander getrennt. In Spur 1, 7 und 14 von Abb. 12 sind Molekulargewichts- Standarts aufgetragen. Die entsprechenden Molekulargewichte sind in der Legende

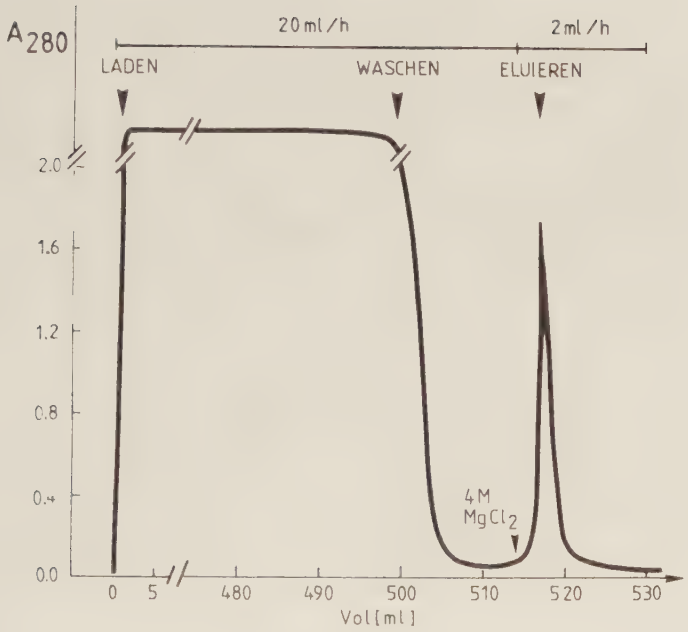

Abb. 11: Elutionsprofil einer Affinitätschromatographie auf einer Protein A- Sepharose- Säule zur Reinigung von Immunglobulin G aus Hybridoma- Kulturüberstand. Säule: 1 ml Protein A- Sepharose. Waschpuffer: 25 mM Tris/150 mM NaCl, pH 8.0 (TN); Elutionspuffer: 4M $MgCl_2$ in TN.

zu Abb. 12 angegeben. Der Standart für das Molekulargewicht 14.000 lief unter den gewählten Bedingungen gemeinsam mit der Lauffront des Gels, so daß dieser Molekulargewichtsbereich nicht aufgetrennt wurde.

Spur 2 zeigt eine Ascites- Probe der Hybridoma- Zellinie 8318. Die am stärksten angefärbte Bande hat ein Molekulargewicht von 66.000 und stellt wahrscheinlich Mäuseserum- Albumin dar. In Spur 3 sind die von eine Protein A- Sepharose- Säule

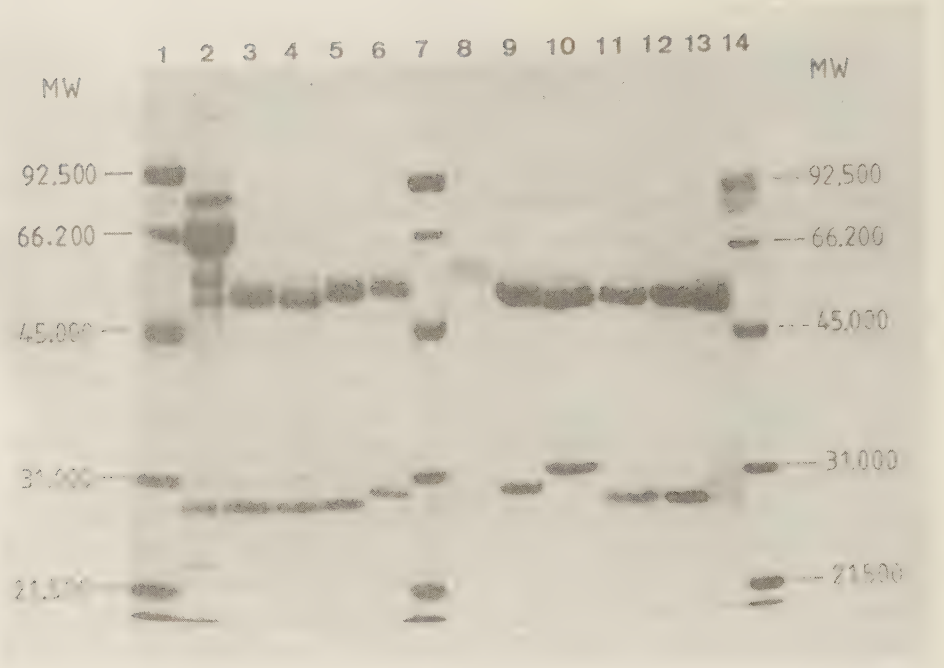

Abb. 12: SDS- Polyacrylamid- Gel mit affinitätschromatographisch gereinigten monoklonalen Antikörpern. Spur 1, 7 und 14 : Molekulargewichts- Standarts. Die entsprechenden Molekulargewichte sind (von oben nach unten): 92.500 (Phosphorylase B), 66.200 (Rinderserum- Albumin), 45.000 (Ovalbumin), 31.000 (Carbo- Anhydrase), 21.500 (Sojabohnen Trypsin Inhibitor) und 14.400 (Lysozym). Das letztgenannte Protein lief unter den gewählten Bedingungen gemeinsam mit der Lauffront des Gels. Spur 2 zeigt eine Ascites- Probe der Antikörper der Zellinie 8318. In Spur 3 ist die gleiche Ascites- Probe nach affininitätschromatographischer Reinigung aufgetragen. Spur 4 zeigt eine Probe der aus Zellkulturüberstand isolierten Antikörper der Zellinie 8318. Spur 5: 8407, aus Zellkulturüberstand. Spur 6: 7724, aus Zellkulturüberstand. Spur 8: 8416, aus Zellkulturüberstand, Spur 9: 7721, aus Zellkulturüberstand, Spur 10: 2G9, aus Zellkulturüberstand, Spur 11: 8409, aus Zellkulturüberstand, Spur 12: 8423, aus Zellkulturüberstand, Spur 13: polyvalentes, gereinigtes Kaninchen- IgG.

gebundenen und eluierten Proteine dergleichen Ascites- Präparation aufgetragen. Durch diesen Schritt wurden die Kontaminationen der Ascitesflüssigkeit mit anderen Proteinen weitgehend entfernt, so daß nur noch zwei Banden mit den Molekulargewichten ca. 51.000 und ca. 27.000 zu erkennen sind. Diese entsprechen den schweren und leichten IgG- Ketten. Der Literaturwert für die schweren Ketten der IgG Antikörper ist ca. 50.000 (53), der für die leichten Ketten ca. 25.000 (53). Spur 4 zeigt eine andere Präparation des Antikörpers 8318, der hier jedoch aus Zellkulturüberstand durch affinitätschromatographische Reinigung isoliert wurde.

In diesen drei Präparationen des Antikörpers 8318 laufen die beiden für Immunglobuline charakteristischen Proteinbanden identisch. Spur 5 und 6 enthalten Proben der monoklonalen Antikörper 8407 und 7724. Insbesondere die leichten Ketten des Antikörpers 7724 (Spur 6) laufen anders im Gel als die von 8407; sie entsprechen Molekulargewichten von ca. 28.000 (7724) bzw. ca. 24.000 (8407). Die Spuren 8 bis 11 enthalten Proben der Antikörper 8416 (Spur 8), 7721 (Spur 9), 2G9 (Spur 10) und 8409 (Spur 11). In Spur 8 war die aufgetragene Proteinmenge zu gering; die leichten Immunglobulinketten sind kaum zu erkennen. Die schweren Ketten dieses Antikörpers laufen an einer Position, die in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 55.000 liegt. Auffällig ist der Unterschied im Laufverhalten der leichten Immunglobulin- Ketten zwischen den Antikörpern 2G9 (Spur 10) und den anderen Antikörpern, die in den Spuren 2 bis 11 gezeigt sind. Alle diese Antikörper gehören zur Immunglobulinklasse IgG3 Kappa (siehe auch Tabelle 3). Die leichten Ketten des Antikörpers 2G9 laufen an einer Stelle im Gel, die einem Molekulargewicht von ca. 30.000 entspricht. Spur 12 zeigt eine Präparation des Antikörpers 8423. Die schweren und leichten Immunglobulin- Ketten verhalten sich in der SDS- PAGE wie die Antikörper der Zellinie 8409, obwohl 8423 zur Immunglobulin- Subklasse IgG2a und 8409 zur Subklasse IgG3 gehören. In Spur 13 ist zum Vergleich polyklonales Kaninchen- IgG aufgetragen worden, das affinitätschromatographisch gereinigt

wurde. Im Bereich der leichten Immunglobulinketten ist auf diesem Gel lediglich ein breit gestreuter Bereich anstatt einer definierten Bande zu erkennen. Der Grund für diesen Effekt ist nicht bekannt.

3.3. Bestimmung der Antigen- Spezifität der isolierten monoklonalen Antikörper.

Zum ersten Nachweis von Hybridomas, die monoklonale Antikörper gesuchter Spezifität produzieren, wurde ein indirekter ELISA mit Gesamtmembranen der für die Immunisierung verwendeten E. coli- Stämme als Antigen verwendet. Zur Differenzierung von O1- LPS- spezifischen Hybridoma- Zellinien und Zellinien, die Immunglobuline mit Spezifität für andere Antigene sezernieren, wurden Kulturüberstände, die im Membran- ELISA stark reagiert hatten, in einem zweiten ELISA getestet, bei dem gereinigtes LPS des Typs O1A bzw. O1A1 als Antigen verwendet wurde. Hybridomas, die in diesem Test nicht reagierten, also nicht LPS- spezifisch waren, wurden wie in 3.3.1 beschrieben weiter untersucht. Die Spezifitätsbestimmung für LPS- spezifische monoklonale Antikörper ist unter 3.3.2 beschrieben.

3.3.1 Bestimmung der Spezifität der monoklonalen Antikörper, die nicht mit dem O1 LPS reagieren.

In zwei unabhängigen Fusionen wurden zwei Maus- Hybridoma-Zellinien isoliert, deren Antikörper in dem Membran- ELISA, aber nicht in dem O1- LPS- ELISA stark positiv reagierten. Die Spezifität dieser Antikörper, 7306 und 8423, wurde mit Hilfe einer Western Blot Analyse bestimmt. Dazu wurden Gesamtmembranen einer Reihe von E. coli- Stämmen mit einer SDS- PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und immunochemisch angefärbt. Abb. 13 zeigt im linken Teil das mit Coomassie-Blau angefärbte SDS- Polyacrylamid- Gel von 13 Gesamtmembranen, die von verschiedenen E. coli- Stämmen isoliert wurden. Diese Stämme gehören verschiedenen Klonen an, haben unter-

schiedliche O:K- Serotypen und zeigen bei der SDS- PAGE unterschiedliche Laufmuster der Proteine der äußeren Membran. Zum Vergleich wurde ein "rauher" E. coli K- 12 Laborstamm mit in die Untersuchung aufgenommen (P400; Spur 12). Der rechte Teil von Abb. 13 zeigt einen Western Blot dieses Gels. Der Blot wurde mit dem Maus- monoklonalen Antikörper 7306 behandelt und die Bindung dieses Antikörpers wurde immunchemisch nachgewiesen. Der Antikörper reagierte mit einem einzigen Membranprotein, das bei allen untersuchten Stämmen vorhanden war. Seine Reaktion mit dem entsprechenden Membranprotein des O1:K1-Stammes mit Membran- Proteinmuster 5 war wegen der geringen eingesetzten Proteinmenge nur sehr schwach (Spur 5, Teil B). Bei größeren Proteinmengen war jedoch eine starke Reaktion zu beobachten (nicht gezeigt).

Das Protein, mit dem der monoklonale Antikörper 7306 reagiert, befindet sich in der Region, wo das OmpA Protein läuft (MW 36.000) (10). Um festzustellen, ob das OmpA Protein das Antigen für den Antikörper 7306 darstellt, wurde die Hitzemodifizierbarkeit dieses Proteins ausgenutzt. Abb. 14 zeigt in Teil A ein Coomassie- gefärbtes SDS- Polyacrylamid- Gel, auf dem bakterielle Membranen aufgetrennt wurden und in Teil B einen Western Blot dieses Gels. Gezeigt ist jeweils nur der Bereich der Hauptproteine der äußeren Membran. Die Proben in Spur 1 und 2 sind Membranpräparationen des Stammes A110 (O1:K1, Membran- Proteinmuster 9), die Proben in Spur 3 und 4 sind Membranpräparationen des Stammes RS228, der zum Serotyp O18:K1 gehört und der das Membran- Proteinmuster 6 hat. Die Proben in Spur 1 und 4 wurden vor dem Laden des Gels kurz durch Kochen in Probenpuffer denaturiert. Die Proben in Spur 2 und 3 wurden dagegen vor dem Laden des Gels für 10 min. bei 37 °C inkubiert. Beim Vergleichen der Spuren 1 und 4 mit den Spuren 2 und 3 kann man deutlich die schnellere Migration des hitzemodifizierten OmpA Proteins erkennen. Das Ergebnis des Western Blot zeigte, daß der verwendete monoklonale Antikörper 7306 mit der Bande reagierte, die das OmpA Protein darstellt, auch wenn dieses Protein hitzemodifiziert wurde.

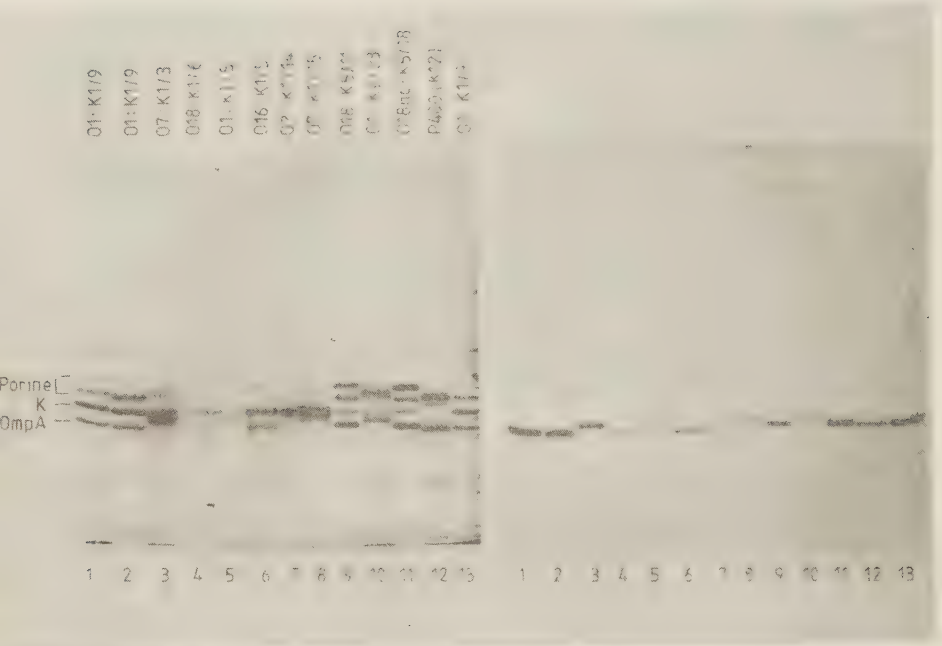

Abb. 13: SDS- PAGE und Western Blot Analyse zur Erkennung der Spezifität des monoklonalen Antikörpers 7306. Die Stammnummern ( ) der E. coli- Stämme und die Bezeichnung der Laufmuster der Proteine der äußeren Membran entsprechen der Nomenklatur in (1). Linker Teil: SDS- Polyacrylamid-Gel (Coomassie- Blau gefärbt). Vertreter folgender O:K- Serotypen/Membranproteinmuster wurden analysiert: Spur 1: O1:K1/9 (41), Spur 2: O1:K1/9 (41), Spur 3: O7:K1/3 (165), Spur 4: O18:K1/6 (102), Spur 5: O1:K1/5 (9), Spur 6: O16:K1/12 (205), Spur 7: O?:K1/14 (232), Spur 8: O7:K1/15 (192), Spur 9: O18:K5/11 (133) Spur 10: O1:K?/9 (60), Spur 11: O18:K5/18 (123), Spur 12: P400 (rauher Stamm), Spur 13: O1:K1/9 (41). Rechter Teil: Western Blot dieses Gels und immunchemische Färbung der Nitrocellulose- Membran mit dem monoklonalen Antikörper 7306 und dem alkalische Phosphatase- gekoppelten Anti Maus- Immunglobuline- Konjugat, wie in 2.2.9 beschrieben.

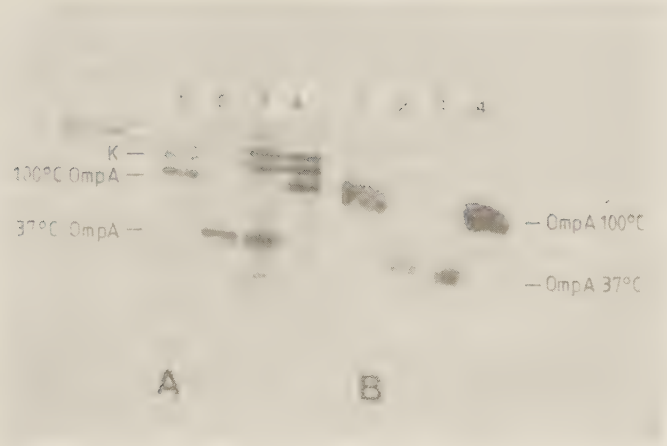

Abb. 14: SDS- PAGE (Teil A) und Western Blot (Teil B) Analyse der Reaktivität des monoklonalen Antikörpers 7306 auf Membranpräparationen nach Inkubation in 37 bzw. 100 °C. Spur 1 und 2: Membranpräparationen des Stammes A110 (O1:K1, Membran- Proteinmuster 9). Spur 3 und 4: Membranpräparationen des Stammes RS228 (O18:K1, Membran- Proteinmuster 9). Gezeigt ist der Bereich der Hauptproteine der äußeren Membran. Die Proben für Spur 1 und 4 wurden vor dem Auftragen kurz in Probenpuffer gekocht, die Proben für Spur 2 und 3 bei für 10 min. bei 37 °C inkubiert. Das SDS- Polyacrylamid- Gel wurde mit Coomassie- Blau gefärbt, die Antikörper-Reaktionen wurden durch eine Enzym- Immunfärbung dargestellt.

Der andere nicht O1- LPS- spezifische monoklonale Antikörper 8423 zeigte die gleiche Spezifität (nicht gezeigt). Die Ergebnisse, die in Abb. 13 und 14 dargestellt sind, zeigen, daß die monoklonalen Antikörper eine antigene Determinante erkennen, die dem OmpA Protein von vielen E. coli- Stämmen, einschließlich dem E. coli-K-12- Stamm P400 gemeinsam ist.

Die Bindung der beiden monoklonalen Antikörper an das OmpA-Protein wurde mit Immunfluoreszenz untersucht. Dazu wurden die lebenden Bakterien wie für die Immun- Elektronenmikroskopie vorbereitet. Es wurden der O1:K1- Stamm A110 und der E. coli K-12 Stamm P400 verwendet. Keiner der beiden monoklonalen Antikörper konnte an diese Bakterien binden (nicht gezeigt).

3.3.2 Reaktivität der O1 LPS- spezifischen monoklonalen Antikörper mit verschiedenen E. coli-Stämmen.

LPS- spezifische Hybridoma- Kulturen wurden durch einen indirekten ELISA nachgewiesen, bei dem LPS des Typs des zur Immunisierung benutzten Stammes (O1A bzw. O1A1) zum Beschichten der ELISA- Platten verwendet wurde. In der Einleitung wurde schon darauf hingewiesen, daß die E. coli Bakterien, die zum Serotyp O1 gehören, trotz übereinstimmendem O- Serotyp nicht miteinander identisch sind. Die meisten Isolate ließen sich einem von zwei Klonen zuordnen, die sich voneinander in einer großen Anzahl von Eigenschaften unterschieden (1) und deren LPS mit O1A1 und O1A bezeichnet wurden. Außer diesen beiden Klonen gab es einige Stämme, die sich u.a. anhand ihrer spezifischen Laufmuster der Hauptproteine der äußeren Membran sowie der des Lipopolysaccharids von den Vertretern der beiden Haupt- Klone innerhalb der O1:K1 E. coli unterschieden. Diese Ausnahmestämme besaßen LPS des Typs O1B oder O1C.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten vergleichende Untersuchungen von Bakterien des O1- Serotyps durchgeführt werden. Dazu wurde auch die Reaktion der LPS- spezifischen monoklonalen Antikörper mit drei Typisierungsstämmen getestet, deren O- Serotyp als mit dem O1- Serotyp kreuzreagierend beschrieben worden war (60) und die mit den hier erzeugten Antiseren S813 und S815 reagierten (siehe dazu 3.4.1). Diese Stämme waren (Serotyp): 30w (O117), E519-66 (O148) und E1541-68 (O154). Für diesen Zweck wurden Membranpräparationen dieser drei Stämme als Antigen im indirekten ELISA eingesetzt. Die zehn LPS- spezifischen monoklonalen Antikörper reagierten mit

keinem dieser Typisierungsstämme; d.h. sie sind nur O1- LPS-spezifisch (soweit getestet).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die isolierten monoklonalen Antikörper Epitope erkennen, die allen O1- LPS-Typen gemeinsam sind oder ob sie solche erkennen, die nicht bei allen Typen vorhanden sind.

Hierzu wurden Mikro- Agglutinations- Tests mit gekochten Bakterien wie in 2.2.6 beschrieben durchgeführt. Unter Verwendung von herkömmlichen Seren werden dabei häufig Titer erreicht, die weit über 1: 1.000 liegen.

Bei der Ratte X Ratte- Fusion wurden zwei Hybridoma- Zelllinien isoliert: 3218 und 3416. Der Antikörper 3416 gehört zur IgM- Klasse, der Antikörper 3218 zur Ratten- Immunglobulinsubklasse IgG2b. Abb. 15 zeigt das Ergebnis eines Agglutinationsversuchs unter Verwendung von Zellkulturüberstand des monoklonalen Ratten- Antikörpers 3416, der zur IgM- Immunglobulin-Klasse gehört. Die nicht agglutinierten Bakterien sind in Abb. 15 als Punkt in der Mitte einer Kavität der Mikrotiterplatte zu erkennen (es wurden Platten mit U- förmigem Boden verwendet). Folgende Stämme mit dem O1- LPS vom Typ O1A wurden untersucht: A110 (Reihe 1), A25 (2), A265 (3), A205 (4), A190 (5), A226 (6), A209 (10). Von den Stämmen mit dem LPS- Muster O1A1 wurden hier folgende untersucht: A15 (11) und RS168 (12). A47 (Reihe 7) synthetisiert LPS des Typs O1C. Die Stämme A206 (Reihe 8) und A221 (Reihe 9) hatten ein LPS des Typs O1B. Wie Abb. 15 zeigt, reagiert das Kaninchen- Immunserum S815, das gegen einen Vetreter der O1:K1 E. coli mit dem LPS des Typs O1A1 erzeugt worden war, mit allen hier untersuchten Stämmen bei der gewählten Verdünnung von 1: 100. Spätere Versuche ergaben, daß dieses Serum auch noch bei weit höheren Verdünnungen mit allen hier untersuchten Bakterienstämmen reagierte (siehe unten).

Bei keinem der hier untersuchten Bakterienstämme war eine

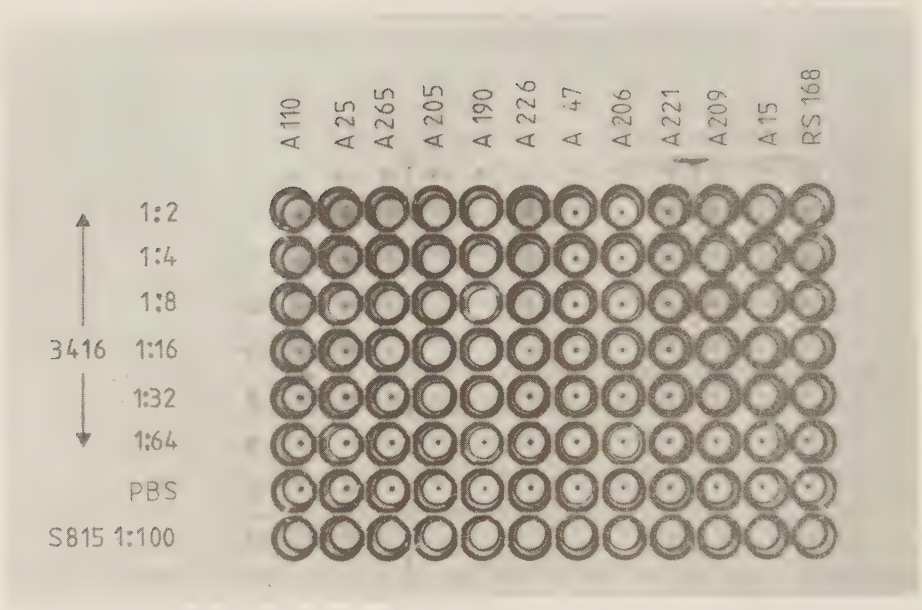

Abb. 15: Mikro- Agglutination von zwölf E. coli- Stämmen mit dem Ratten- monoklonalen Antikörper 3416. Als Negativkontrolle wurde PBS benutzt, als Positivkontrolle das Immunserum S815.

spontane Agglutination zu beobachten, die man in Reihe G als das Fehlen des Punktes aus gekochten und über Nacht sedimentierten Bakterien sehen würde.

Im Gegensatz zu dem polyklonalen Kaninchenserum agglutinierte der monoklonale Antikörper 3416 nur Bakterien, die entweder LPS des O1A1 oder des O1A Typs hatten. Alle untersuchten 9 Stämme des O1A LPS- Typs und alle 5 untersuchten Stämme des O1A1 LPS- Typs (teilweise nicht gezeigt) wurden durch 3416 agglutiniert. Dieser monoklonale Antikörper erkannte jedoch

keine für das O1A1- LPS exklusive Determinante. Der Titer der Kulturüberstände war mit 1:8 (Spur 2) bis 1:32 (Spur 5) relativ niedrig, aber spezifisch und reproduzierbar.

Bei direkter Verwendung von Kulturüberständen der isolierten Maus- Hybridomas der IgG3 Subklasse wurden dagegen nur Titer von 1:2 bis 1:4 erzielt. Die Benutzung von Ascites- Flüssigkeit brachte trotz des höheren ELISA- Titers keine erhebliche Verbesserung. Bei Einsatz von affinitätschromatographisch gereinigten Antikörpern zeigte es sich, daß diese Präparate eine unspezifische Agglutination mit allen untersuchten Bakterienstämmen hervorriefen, wenn sie unverdünnt eingesetzt wurden. Die Proteinkonzentration der Antikörperpräparate (Endkonzentration), bei der eine solche unspezifische Reaktion zu beobachten war, lag bei ca. 100 µg/ml. Bei einer Verdünnung dieser Präparate konnte man jedoch eine spezifische Agglutination beobachten. Allerdings lag der spezifische Agglutinationstiter dieser Antikörperproben nur bei 1:4 bis 1:8. Diese Antikörper, die alle zur Maus IgG3- bzw. zur Ratten- IgG2b-Klasse gehörten, wurde daher zur Untersuchung von Bakterien mit Agglutination nicht verwendet. Die Gründe für diese unspezifische Agglutination sind unklar.

Die Klassifizierung der E. coli- O1- Stämme in zwei Gruppen, die relativ nah verwandt sind (O1A und O1A1) und zweier anderer O1- Gruppen korrelliert mit den Ergebnissen der SDS-PAGE (Abb. 6): Die monoklonalen Antikörper reagierten nur mit O1A und O1A1- Bakterien. Der monoklonale IgA- Antikörper 8507 wurde hierbei nicht getestet.

Die Agglutination von gekochten Bakterien ist eine etablierte Methode, um eine große Anzahl von Bakterien- Stämmen testen zu können. Zur Untersuchung der Reaktivität einer Reihe von monoklonalen Antikörpern mit einigen charakteristischen Vertretern wurden andere, moderne Methoden (Immunfluoreszenz, Immun- Elektronenmikriskopie, Western Blotting) eingesetzt.

3.3.3 Darstellung der Antigen- Antikörper- Reaktion mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz.

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz bietet die Möglichkeit, die Bindung von Antikörpern an Bakterienoberflächen zu visualisieren.

Lebende Bakterien wurden zunächst mit gegen O1 LPS- gerichteten monoklonalen Antikörpern und danach mit einem FITC- konjugiertes Antiserum inkubiert. Dabei konnten die monoklonalen Antikörper nur mit bakteriellen Antigenen reagieren, die zugänglich für die Immunglobuline an der Bakterien- Oberfläche liegen. Abb. 16 zeigt das Ergebnis eines solchen Experiments. Verglichen wurde ein O1:K1- Stamm mit LPS des Typs O1A mit einem O18:K1- Stamm. Es ist deutlich zu erkennen, daß der eingesetzte monoklonale Maus- Antikörper 8416 (IgG3) mit dem Stamm A110 stark reagierte, mit dem O18:K1- Stamm dagegen gar nicht. Untersuchungen einer Reihe von E. coli- Stämmen mit unterschiedlichen Typen von O1 LPS zeigten, daß der hier eingesetzte Antikörper 8416 nur mit Bakterien reagierte, die entweder LPS des Typs O1A1 oder O1A hatten. Bakterien mit LPS des Typs O1B bzw. O1C wurden nicht erkannt.

3.3.4 Nachweis der in vivo Antigen- Antikörper- Reaktion mit Hilfe der Protein A- Gold- Elektronenmikroskopie.

Um eine Bindung von Antikörpern an Bakterien besser nachweisen zu können, wurde eine Immunogold- elektronenmikroskopische Methode eingesetzt.

Eine Reaktion von Antikörpern mit der Bakterienoberfläche wurde hierbei mit Hilfe eines Protein A- Gold- Konjugates dargestellt. Bei einer Antikörperbindung konnte man auf der Oberfläche der Bakterien elektronendichte Gold- Partikel erkennen. Es wurden affinitätschromatographisch gereinigte Präparationen folgender monoklonaler Antikörper verwendet: 2G9, 7721, 7724, 8407, 8409, 8416, 8318. Alle Antikörper reagierten identisch.

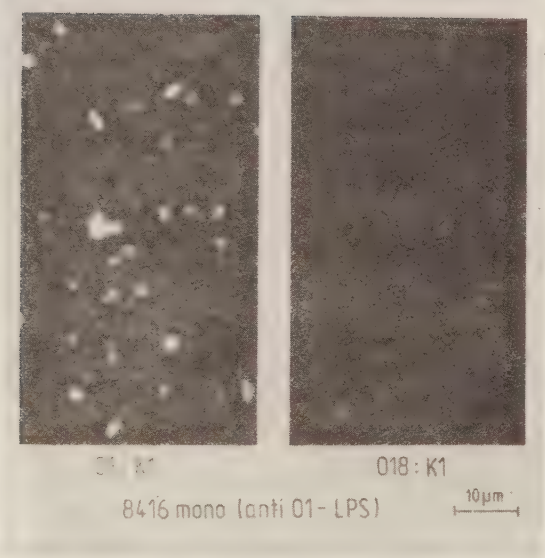

Abb. 16: Indirekte Immunfluoreszenz mit verschiedenen E. coli- Stämmen. Linker Teil: Stamm A110 (O1:K1, LPS O1A), rechter Teil Stamm RS228 (O18:K1). Die Bakterien wurden mit dem Maus- monoklonalen Antikörper 8416 und anschließend mit einem FITC markierten Anti- Maus- Immunglobulin- Konjugat behandelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Abb. 17 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuchs. Zwei E. coli- Stämme wurden hierbei mit dem monoklonalen Antikörper 7724 behandelt. Einer der Stämme (A110) besaß ein LPS des Typs O1A, der andere (A206) hatte ein LPS des Typs O1B. In

Abb. 17: Immunogold- Elektronenmikroskopische Untersuchung von verschiedenen E. coli- Stämmen. Linker Teil: Stamm A110 (O1:K1, LPS O1A), rechter Teil Stamm A206 (O1:K?, LPS O1B). Die Bakterien wurden mit dem affinitätschromatographisch gereinigten Maus- monoklonalen Antikörper 7724 und anschließend mit einem Gold (10nm)- markierten Protein A -Konjugat behandelt und nach "negativ staining" mit dem Elektronenmikroskop untersucht.

Abb. 17 ist im linken Teil ein Bakterium des Stammes A110 abgebildet, das mit einer großen Anzahl von kugelförmigen Gold-Partikeln bedeckt ist. Diese Partikel konzentrieren sich auf "Ausstülpungen" der normalerweise glatt erscheinenden Bakterienoberfläche. Offensichtlich ist die Struktur der Bakterienmembran durch die Einwirkung der Antikörper verändert worden.

In der Umgebung dieses Bakteriums ist nicht ein einziges

LPS- Typ	untersuchter Stamm	Reaktion mit 7 Maus-monokl. Ak.+ Protein A- Gold
O1A	A110	ja
O1A1	A109	ja
O1B	A206	nein
O1C	A47	nein

Tabelle 4. Reaktion der Maus X Maus monoklonalen Antikörper bei der Protein A- Gold- Immunelektronenmikroskopie mit Vertretern der vier gefundenen O1- LPS- Typen.

Gold- Partikel zu erkennen, d.h. es gab nur spezifische Antikörper/Protein A Gold- Bindungen. Im rechten Teil von Abb. 17 ist die Reaktion des monoklonalen Antikörpers 7724 mit einem Bakterium mit O1B- LPS (Stamm A206) dargestellt. Dieses Bakterium ist vollkommen frei von Gold- Partikeln; d. h. an diesem Bakterium hat der monoklonale Antikörper nicht gebunden. Mit dieser Methode wurden Stämme aller vier verschiedenen O1- LPS Gruppen mit den sieben verschiedenen Maus- monoklonalen Antikörpern untersucht. Tabelle 4 faßt die Ergebnisse zusammen. Die zur Untersuchung ausgewählten Maus- Antikörper reagierten ausschließlich mit E. coli- Stämmen, die LPS der Typen O1A1 und O1A hatten. Die Ratten- monoklonalen Antikörper

wurden bei dieser Untersuchung nicht verwendet. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Giovanna Morelli und Marion Kamke, Berlin, durchgeführt.

3.3.5 Immunologische Untersuchung der Lipopolysaccharid-Typen innerhalb des Serotyps O1 mit Western Blotting.

Lipopolysaccharid besteht aus drei strukturell unterschiedlichen Komponenten: Lipid A, dem Core Oligosaccharid und dem O- spezifischen Polysaccharid. Die isolierten monoklonalen Antikörper wurden als LPS- spezifisch bezeichnet, wenn sie im ELISA- Test mit gereinigtem LPS reagierten. Um die Spezifität der monoklonalen Antikörper dem Lipid A- Core- Bereich oder dem O- spezifischen Polysaccharid zuschreiben zu können, wurde ein modifizierter Western Blot verwendet. Wie unter 2.2.9 beschrieben wurde dazu gereinigtes LPS, das mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt wurde, in einem Phosphatpuffer auf Nitrocellulose transferiert. Die Bindungsspezifität der verwendeten Antikörper wurde mit Hilfe einer Immunfärbemethode visualisiert. Abb. 18 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuchs. Spur A zeigt einen mit Silbernitrat gefärbten Gelstreifen eines SDS- Polyacrylamid- Gels, auf dem LPS des Stammes A109 (O1A1) aufgetrennt wurde.

Im unteren Bereich des Gels ist eine breite Bande zu erkennen. Sie entspricht dem Lipid A- Core- Bereich (44). Es schließen sich die längerkettigen LPS- Moleküle an, die in unterschiedlicher Anzahl Oligosaccharid- Wiederholungseinheiten enthalten, so daß Hauptgruppen mit Molekülen unterschiedlicher Kettenlänge zu erkennen sind (44). In Spur B ist ein Western Blot dieses Gels zu sehen, der mit dem monoklonalen Antikörper 7721 spezifisch immunologisch angefärbt wurde. Dieser Antikörper zeigte nur im Bereich der O- Wiederholungseinheiten eine Reaktion, nicht aber im Lipid A- Core Bereich. In Spur C wurde solch ein Western Blot mit dem Core- spezifischen monoklonalen Antikörper 786- D10 behandelt. Dieser monoklonale Antikörper wurde von Prof. Dr. Bitter- Suermann, Mainz, zur Ver-

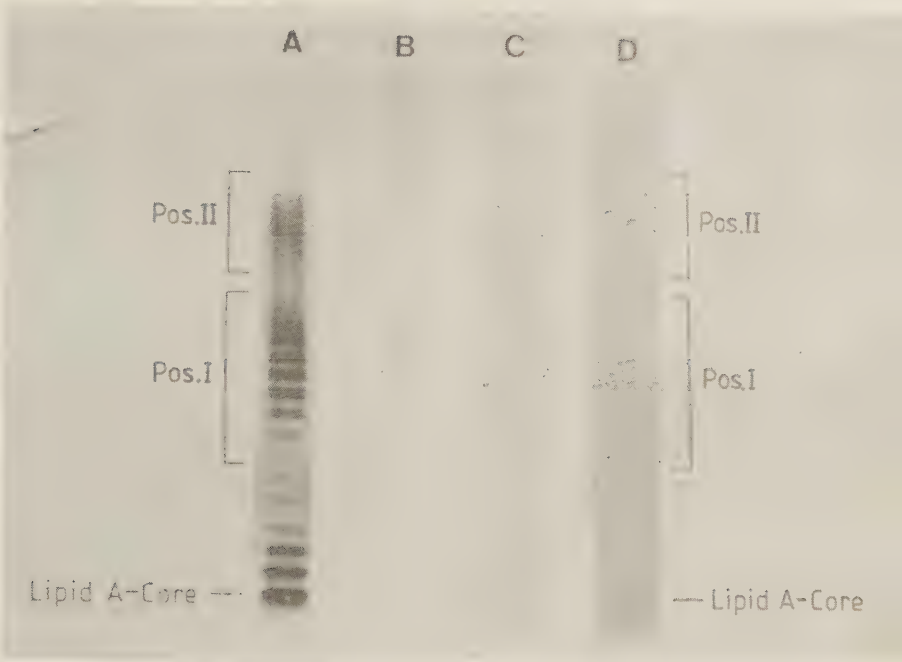

Abb. 18: SDS- PAGE und Western Blot Analyse zur Erkennung der Spezifität der isolierten monoklonalen Antikörper gegen das O1 LPS. A: SDS- Polyacrylamid- Gel mit durch Silbernitrat gefärbtem O1A1 LPS (Stamm A109), B: Western Blot von diesem Gel, Antikörper- Reaktion mit dem monoklonalen Antikörper 7721 (O1 LPS- spezifisch), C: wie B, Antikörper- Reaktion mit monoklonalem Antikörper 786 D10 (Core- spezifisch), D: wie B, Antikörper- Reaktion mit den monoklonalen Antikörpern 7721 und 786 D10. Die Antikörper- Reaktionen wurden durch eine Enzym- Immunfärbung dargestellt.

fügung gestellt. Dort wurde auch die Core- Spezifität dieses Antikörpers bestimmt.

Dieser Antikörper reagierte mit der Lipid A- Core- Region

auf dem Blot. Dadurch konnte gezeigt werden, daß der Lipid A-Core- Anteil des LPS auf die Nitrocellulose transferiert wurde und auch immunologisch zugänglich war. In Spur D wurde solch ein Blot mit einer Mischung aus den monoklonalen Antikörpern 7721 und 786- D10 behandelt. Auch hier ist die Lipid A-Core- Region deutlich zu erkennen. Zusätzlich sind hier aber auch die Molekülbanden mit O- spezifischen Lipopolysaccharid-Seitenketten zu erkennen. Die Gründe für die relativ schache Intensität der Anfärbung sind nicht bekannt; möglicherweise spielt eine schwache Avidität der monoklonalen Antikörper eine Rolle.

Das hier dargestellte Experiment zeigte, daß der monoklonale Antikörper 7721 gegen die O- spezifische Seitenkette des O1 LPS gerichtet ist. Alle 10 isolierten Ratten- und Maus- monoklonalen Antikörper, die im ELISA als LPS- spezifisch identifiziert wurden, zeigten auf solchen Western Blots diese O-Antigen- Spezifität.

Zur immunologischen Untersuchung der verschiedenen Typen von O1- LPS wurden gleiche Mengen von gereinigtem LPS der Typen O1A, O1A1, O1B und O1C mit einer SDS- PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch auf Nitrocellulose übertragen. Anschließend wurden die Blots mit den isolierten monoklonalen Antikörpern bzw. einem Immunserum, das gegen einen E. coli- Stamm mit O1A-LPS gewonnen wurde, behandelt und enzymatisch gefärbt. Abb. 19 zeigt in Teil A das Silbernitrat -gefärbte SDS- Polyacrylamid-Gel der vier verschiedenene O1 LPS- Typen. Im unteren Bereich des Gels ist die Lipid A- Core- Region zu sehen. Spur 1 zeigt eine Probe von O1A- LPS, Spur 2 zeigt O1A1- LPS. Es ist zu erkennen, daß dieses LPS als eine Reihe von Doppelbanden auf der SDS- PAGE aufgetrennt wurde, deren obere parallel zu der Reihe von Einzelbanden lief, die für das O1A LPS charakteristisch ist. Die Spuren 3 und vier zeigen LPS des Typs O1C bzw. O1B.

In Teil B von Abb. 19 ist ein Western Blot von solch einem SDS- Polyacrylamid- Gel dargestellt. Die Reihenfolge der Pro-

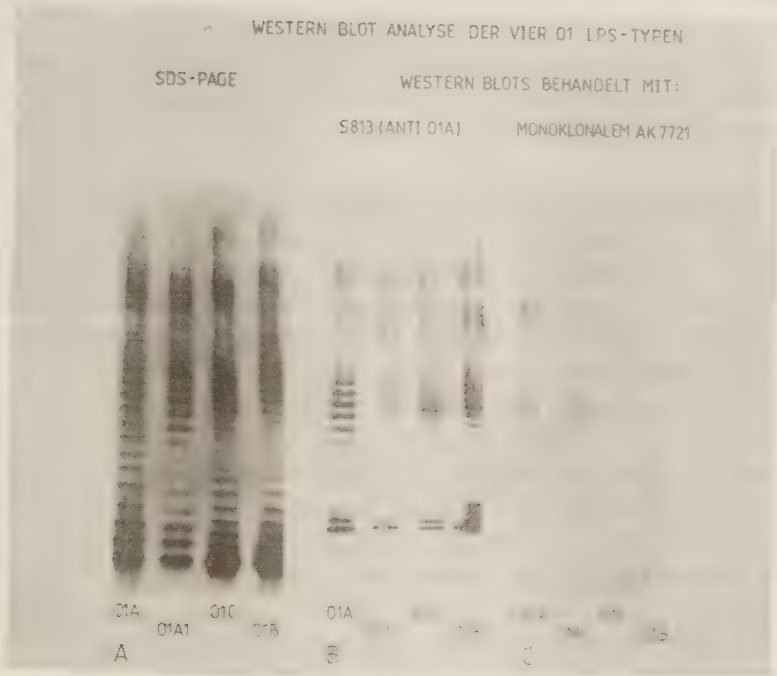

Abb. 19: SDS- PAGE und Western Blot Untersuchung der vier LPS- Typen innerhalb der O1- Serogruppe von E. coli. A: SDS- Polyacrylamid- Gel mit vier LPS- Typen. B: Western Blot davon, mit unadsorbiertem S813 behandelt. C: Western Blot davon, mit monoklonalem Antikörper 7721 behandelt.

ben ist die gleiche wie in Teil A. Dieser Blot wurde immunchemisch mit dem unadsorbierten Anti O1A- Antiserum S813 angefärbt. Dieses Serum enthielt Antikörper, die mit allen vier Typen von O1 LPS reagierten. In Teil C ist ein solcher Blot wiedergegeben, der mit dem monoklonalen Maus- Antikörper 7721 behandelt wurde. Dieser Antikörper erkennt nur LPS der O1A und O1A1- E. coli; mit den O1B und O1C LPS ist keine Reaktion zu sehen. Dieses Ergebnis traf für alle 10 O1- LPS- spe-

zifischen (Ratte- und Maus-) monoklonalen Antikörper zu. Auch die beiden Ratten- monoklonalen Antikörper, die nach Immunisierung mit O1A1- Membranen gewonnen wurden, reagierten sowohl mit dem O1A1, als auch mit O1A- LPS. Damit hatten sich die Hoffnungen nicht erfüllt, O1A1- LPS spezifische monoklonale Antikörper zu erhalten.

3.4 Untersuchungen des O1 LPS mit Hilfe von Immunseren.

Gegen je einen Stamm der Gruppe der O1A1 und O1A- E. coli waren Kaninchen- Immunseren (S815 bzw. S813) gewonnen worden. Sie wurden verwendet, um Agglutinationsexperimente und Western Blot Versuche durchzuführen mit dem Ziel, die Gruppe der O1 E. coli serologisch zu untersuchen.

Mit den oben beschriebenen monoklonalen Antikörpern lassen sich die O1A1- und O1A- Stämme von den O1B- und O1C- Stämmen abgegrenzt. Es war jedoch nicht gelungen, die Gruppe der O1A1- Bakterien, deren LPS bei der SDS- PAGE stets als eine Reihe von Doppelbanden läuft von der Gruppe der O1A- E. coli, deren LPS bei der SDS- PAGE als eine Reihe von Einzelbanden läuft, zu unterscheiden.

3.4.1 Mikro- Agglutination von E. coli- Stämmen und Western Blot Analyse mit Kaninchen- Immunseren.

Bei der Mikro- Agglutination von E. coli- Stämmen des Serotyps O1 mit Kaninchen- Immunseren wurden erheblich höhere Titer erreicht als mit monoklonalen Antikörpern (Tabelle 5).

Die beiden Seren wurden auch auf Reaktivität mit den Typisierungsstämmen der Serotypen geprüft, die als kreuzreaktiv für die Gruppe der O1- E. coli beschrieben wurden (60).

Tabelle 5 zeigt die Agglutinationstiter der beiden Seren mit diesen Bakterien. Nur gegen die Stämme 30w (O117), E519-66 (O148) und E1541-68 (O154) waren in beiden Seren nennenswerte

Serum:	S813		S815	
Spezifität:	Anti-O1/A		Anti-O1/A1	
	Bakterien (O-Serotyp)	Titer	Bakterien (O-Serotyp)	Titer
	A183a(O1)	12800	A183a(O1)	6400
	A110(O1A)	12800	A110(O1A)	6400
	A109(O1A1)	12800	A109(O1A1)	6400
	U9-41(O2)	20	U9-41(O2)	20
	Bi 8337-41(O10)	20	Bi 8337-41(O10)	20
	Su4411(O14)	10	Su4411(O14)	10
	U 18-41(O50)	SpAg	U 18-41(O50)	SpAg
	Bi 7327-41(O53)	50	Bi 7327-41(O53)	50
	H 705(O107)	SpAg	H 705(O107)	SpAg
	27w(O115)	50	27w(O115)	50
	30w(O117)	800	30w(O117)	800
	E519-66(O148)	400	E519-66(O148)	50
	D 616(O149)	20	D 616(O149)	20
	1935(O150)	10	1935(O150)	20
	E 1541-68(O154)	400	E 1541-68()154)	400

Tabelle 5. Agglutinations- Titer in unadsorbierten Seren gegen Referenzstämme. SpAg: Stamm agglutinierte spontan.

Agglutinationstiter vorhanden, wobei S815 sich bei der Agglutination des Stammes E519-66 (O148) anders verhielt als S813. S183 agglutinierte diesen Stamm noch bei einer Verdünnung von 1:400, während S815 keine Agglutination bei Verdünnungen über 1:50 zeigte. Mit den anderen als kreuzreagierend beschriebenen E. coli- Stämmen wurden keine signifikanten Agglutinationstiter erreicht. Abb. 20 zeigt im linken oberen Teil das Ergebnis eines Agglutinationsexperiments, das mit einem unadsorbierten Anti O1A- Serum durchgeführt wurde. Dieses Se-

rum (S813) agglutinierte Bakterien aller vier O1 LPS- Typen mit einem Titer von 1: 12.800 (Endverdünnung). Bakterien der Serotypen O117 bzw. O148 wurden noch bei Verdünnungen von 1:800 bzw. 1:400 agglutiniert.

Die Adsorption (wie in 2.2.13 beschrieben) des Serums S813 mit dem homologen Stamm reduzierte die agglutinierende Aktivität gegen alle hier getesteten O1- E. coli- Stämme um mehr als 90%; von 1: 12.800 auf Werte von 1: 50 bis 1: 200. Adsorption mit einem Vertreter des anderen Klons ergab ähnliche Resultate. Nach Adsorption dieses Serums mit einem Stamm einer der beiden Ausnahmegruppen O1B bzw. O1C war gegen diese Stämme kaum mehr agglutinierende Aktivität nachzuweisen; die Aktivität gegen Stämme der O1A1 und O1A- Gruppe sowie gegen Stämme der Serotypen O117 bzw. O148 war nicht vermindert worden.

Der Stamm E 1541-68 (O154) verhielt sich bei Agglutinationsversuchen mit adsorbiertem S815 genau wie der Stamm E 519-66 (O148); bei Agglutination mit adsorbiertem S813 gab es eine Adsorption, nach der der einzige Unterschied im Agglutinationsverhalten zwischen O148 und O154 festzustellen war: nach Adsorption von S813 mit O1B- bzw. O1C- Stämmen agglutinierte dieses Serum den O148- Stamm noch bei einer Verdünnung von 1:400 (Abb. 20); gegen den O154- Stamm war keine Aktivität nachweisbar (nicht gezeigt). Das Anti- O1A1- Serum S815 ergab unadsorbiert etwas niedrige Agglutinationstiter als S813 (Abb. 20). Es agglutinierte Bakterien des LPS- Typs O1A und O1A1 mit einem Titer von 1:6.400, solche mit LPS des Typs O1C und auch O117 mit einem Titer von 1:800. Bakterien mit O1B- LPS wurden von diesem unadsorbierten Serum nur mit einem Titer von 1:200 agglutiniert (nicht gezeigt). Mit Bakterien des Serotyps O148 wurde ein Titer von nur 1:50 erreicht. Nach Adsorption mit Stämmen des O1B bzw. O1C LPS- Typs war die Aktivität gegen diese Stämme fast völlig verschwunden, die Aktivität gegen O1A1 und O1A- E. coli dagegen nicht vermindert. Die Reaktion mit dem kreuzreagierenden Stamm des Serotyps O117 blieb ebenfalls unberührt. Die Adsorption dieses Serums mit dem homolo-

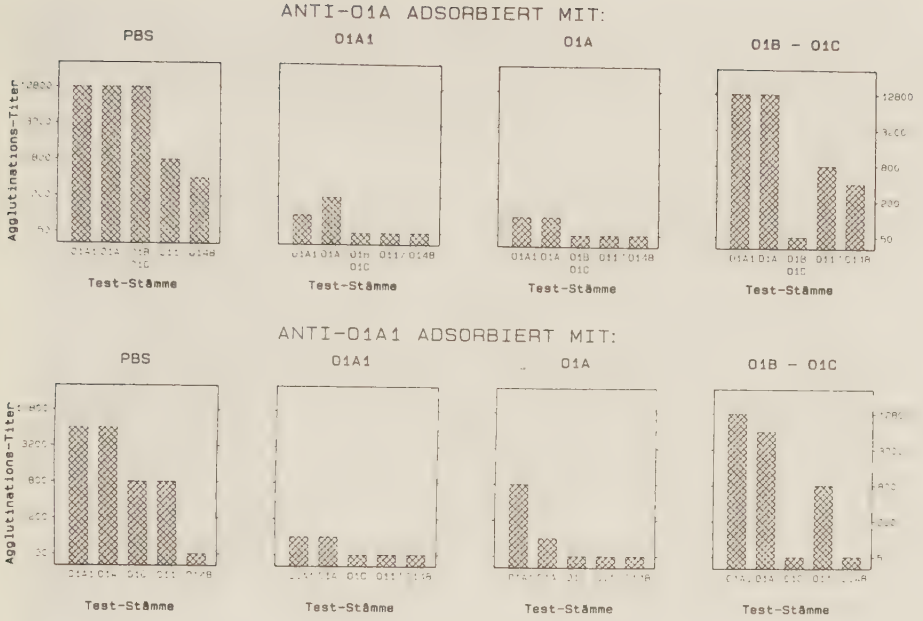

Abb. 20: Agglutinationsversuche mit adsorbierten Seren. Die Adsorptionen und bzw. die Agglutinationen wurden mit folgenden Stämmen durchgeführt: A109 (O1A1), A110 (O1A), A47 (O1C) und A206 (O1B). Da die beiden letztgenannten Stämme stets gleiche Werte zeigten, wurden sie nicht getrennt aufgeführt. Die Titer zeigen Endverdünnungen an.

gen Stamm resultierte in einem Verschwinden der Aktivität gegen alle untersuchten Stämme.

Auffällig war das Ergebnis der Agglutination mit diesem Serum, das gegen einen Stamm der O1A1- Gruppe hergestellt wurde, nach einer Adsorption mit einem Stamm der O1A- Gruppe. Hierbei wurde die Agglutinationsaktivität gegen Bakterien der O1B und O1C- Gruppe sowie gegen den zur Adsorption benutzten Stamm mit

O1A- LPS und gegen den kreuzreagierenden Stamm mit O117- LPS auf ein sehr niedriges Niveau gedrückt. Gegen den homologen Stamm der O1A1- Gruppe, dessen LPS bei der SDS- PAGE stets als Doppelbanden- Muster läuft, war jedoch noch eine recht hohe Aktivität festzustellen (Titer 1:800).

Dieses Serum enthielt also nach dieser Adsorption Antikörper, die mindestens ein Epitop erkannten, das auf O1A1- LPS, aber nicht auf O1A- LPS vorhanden ist.

Die Reaktion dieses adsorbierten Serums wurde auch in einem Western Blot getestet. Abb. 21 zeigt zusammensfassend das Ergebnis dieser Versuche. In Teil A ist ein SDS- Polyacrylamid-Gel dargestellt, auf dem die vier verschiedenen LPS- Typen innerhalb der O1 E. coli Gruppe wiedergegeben sind. In Teil C von Abb. 21 ist nochmals die Reaktivität des monoklonalen Antikörpers 7721 mit den verschiedenen O1- LPS- Typen dargestellt. Nur mit O1 LPS der Typen O1A1 und O1A ist eine Reaktion sichtbar. Hier wurde ein Anti Maus- IgG- Konjugat verwendet, an das alkalische Phosphatase gekoppelt war. In Teil B ist ein Western Blot solch eines Gels dargestellt, der mit dem unadsorbierten Kaninchen- Serum S813 (Anti- O1A) behandelt wurde. Dieses Serum reagiert auf dem in Teil B gezeigten Western Blot- wie auch bei der Agglutination- mit allen vier LPS- Typen des O1- Serotyps.

In Teil D von Abb. 21 ist die Reaktivität des mit einem Stamm mit O1A- LPS adsorbierten Anti O1A1- Serums S815 auf einem solchen Western Blot wiedergegeben. Durch diese Adsorption wurde die Aktivität gegen das O1A- LPS vollständig entfernt (erste Spur). Gegen O1B und O1C- LPS war ebenfalls keine Aktivität mehr nachzuweisen (Spuren 3 und 4).

In Spur 2 ist jedoch eine deutliche Reaktion mit dem dort befindlichen O1A1- LPS zu erkennen. Dieses adsorbierte Antiserum reagiert auf diesem Immunoblot nicht mit beiden Banden dieses Doppelbanden- LPS- Musters; nur die jeweils untere Ban-

Abb. 21: SDS- PAGE und Western Blot Untersuchung der vier LPS- Typen innerhalb der O1- Serogruppe von E. coli. A: SDS- Polyacrylamid- Gel mit vier LPS- Typen. B: Western Blot davon, mit unadsorbiertem S813 behandelt. C: Wie B, mit monoklonalem Antikörper 7721 behandelt. D: Wie B, behandelt mit S815, das mit A110 (LPS- Typ O1A) adsorbiert wurde. Die Immunfärbung der Western Blots wurde mit Anti-Maus IgG alkalische Phosphatase- Konjugaten (Teil C) bzw. Anti- Kaninchen IgM (μ- chain spezifisch)- Peroxidase- Konjugaten (Teil B und D) durchgeführt. Bei den beiden letztgenannten Western Blots wurde ein alkalische Phosphatase konjugiertes (2.2.12) Anti- Peroxidase- Serum als dritter Antikörper eingesetzt.

de wurde angefärbt. Dies wurde durch eine erneute Immunfärbung desselben Western Blots mit unadsorbiertem Anti O1A1- Serum nachgewiesen. Nach dieser erneuten Inkubation wurden alle vier O1- LPS- Typen angefärbt. Dabei war auch das vollständige Doppelbandenmuster zu sehen (nicht gezeigt).

Nach der Inkubation mit den Kaninchen- Seren wurde der Blot mit einem Kaninchen- IgM (µ- chain spezifisch)- Konjugat behandelt. Da dieses Konjugat Peroxidase enthielt, die Immunfärbemethode jedoch mit alkalischer Phosphatase arbeitete, wurde als dritter Inkubationsschritt ein alkalische Phosphatase gekoppeltes Anti- Peroxidase- Präparat (hergestellt wie bei 2.2.12 beschrieben) verwendet.

Die Anfärbungen mit Anti- Kaninchen IgM (µ- chain- spezifisch)- Konjugaten waren wesentlich intensiver als solche mit Anti- Kaninchen IgG- Konjugat (nicht gezeigt), bei denen hauptsächlich nur Banden von Molekülen mit kurzen O- Ketten sichtbar wurden.

3.4.2 Inhibition der Anti- LPS- Antikörperbindung durch O- Polysaccharide.

Mit Hilfe eines Inhibitions- LPS- ELISA wurde untersucht, ob die Bindung von IgG- Antikörpern des Anti O1A1 Kaninchenserums S815 durch gereinigte O- Antigene gehemmt werden kann. Als Antigen im ELISA wurde O1A1- LPS, als Konjugat ein Anti-Kaninchen IgG- (Fc-spezifisches) Peroxidase- Konjugat verwendet.

Das Antiserum S815 wurde vor diesem Versuch mit Bakterien mit O1A LPS adsorbiert (Stamm A110) und im ELISA in einer Endverdünnung von 1:720 eingesetzt. Die O- Polysaccharide wurden durch saure Hydrolyse aus Lipopolysacchariden von O1A1 und O1A- Bakterien isoliert. Sie wurden von Prof. Dr. K. Jann, Freiburg, zur Verfügung gestellt.

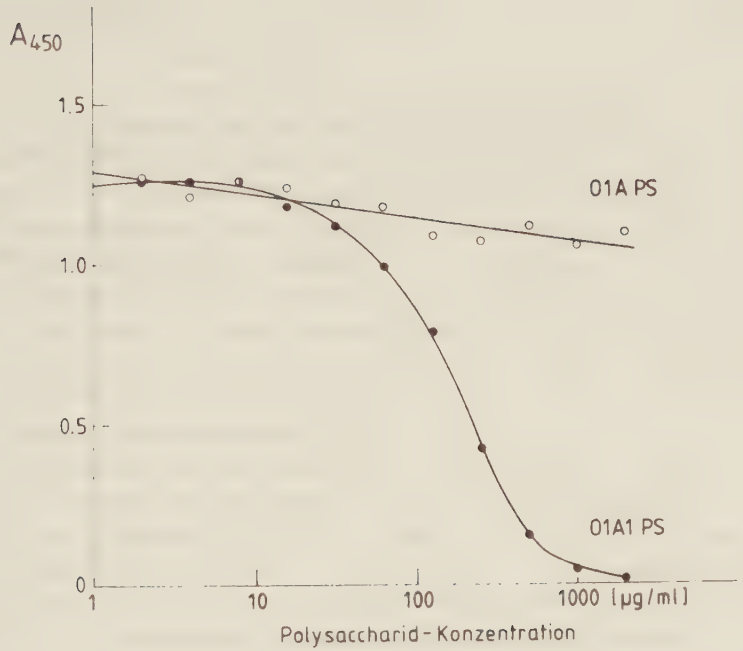

Abb. 22. Inhibitions- ELISA. Gezeigt ist die Inhibition der Bindung von O1A1- spezifischen Antikörpern des Serums S815 an O1A1- LPS, das zum Beschichten einer ELISA- Platte verwendet wurde, durch Polysaccharide, die von O1A und O1A1- LPS isoliert wurden. S815 war zuvor mit Bakterien mit O1A LPS adsorbiert worden. Es wurde in einer Endverdünnung von 1:720 eingesetzt. Die angegebenen Polysaccharid- Konzentrationen sind Endkonzentrationen. Offene Symbole: O1A Polysaccharide, geschlossene Symbole: O1A1 Polysaccharide. Es wurde ein Anti- Kaninchen IgG (Fc-spezifisches) Peroxidase- Konjugat verwendet.

Eine Verdünnungsreihe dieser Polysaccharide wurde mit dem adsorbierten Serum S815 gemischt und sofort darauf in die Kavitäten einer ELISA- Platte gegeben, die mit O1A1- LPS als An-

tigen beschichtet war. Abb. 22 zeigt das Ergebnis diese Versuchs.

Die Verwendung von O1A- Polysacchariden inhibierte die Bindung der Antikörper an das O1A1- LPS an der ELISA- Platte nur sehr wenig. Bei Verwendung der O1A1- Polysaccharide wurde dagegen eine deutliche Inhibition erkennbar, die bei einer Polysaccharid- Konzentration von ca. 40 µg/ml einsetzte und die bei höheren Konzentrationen (1mg/ml) zu einer vollständigen Inhibition der Antikörperbindung führte. Die Verwendung von 100 mM Rhamnose zeigte keinen inhibierenden Effekt (nicht gezeigt).

Analoge Experimente unter Verwendung eines Anti Kaninchen-IgM (µ- chain spezifischen)- Konjugats zeigten keine inhibierende Aktivität der isolierten Polysaccharide auf die Bindung der IgM- Antikörper an das O1A1 LPS (nicht gezeigt). Ein Grund dafür könnte in der höheren Anzahl der antigenbindenden Valenzen pro Molekül im Vergleich zu IgG- Antikörpern liegen. Auch Aviditätsunterschiede könnten eine Rolle spielen. Wegen der limitierten Verfügbarkeit der O- Polysaccharide konnten jedoch keine weiterführenden Experimente durchgeführt werden.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde eine vergleichende serologische Analyse einer Gruppe von Escherichia coli- Stämmen durchgeführt, die dem O- Serotyp O1 zugerechnet werden. Die Mehrzahl der verwendeten Isolate hatte den Kapseltyp K1 und war von einem von zwei weitverbreiteten bakteriellen Klonen zugeordnet worden waren (1). Diese beiden Klone unterscheiden sich in einer großen Anzahl von unabhängigen Eigenschaften. Dazu gehörten u.a. das Muster der Hauptproteine der äußeren Membran und das Muster des LPS bei der SDS- PAGE sowie das Laufmuster einer Reihe von cytoplasmatischen Enzymen bei der Stärkegel- Elektrophorese.

Die Hauptproteine der äußeren Membran von E. coli haben Molekulargewichte im Bereich von ca. 30.000- 40.000. Studien mit E. coli K-12 haben diese Proteine als die Porine und das OmpA-Protein definiert (32). Neuere Untersuchungen (1) haben gezeigt, daß die entsprechenden Proteine natürlicher Isolate bei der SDS- PAGE an etwas anderen Positionen als bei E. coli K-12 laufen können (siehe auch Abb. 13). Kapseltragende E. coli- Stämme haben zusätzlich ein K- Protein, das bei fast allen Isolaten feststellbar ist und dessen Existenz nicht vom Typ der synthetisierten Kapsel abzuhängen scheint (64). Zwischen verschiedenen Stämmen ist bei diesem Protein wenig Variabilität in Bezug auf die Mobilität bei der SDS- PAGE festzustellen (1).

Das OmpA- Protein zeigt dagegen ein recht hohes Maß an Variabilität. Dieses Protein ist bei E. coli K-12 intensiv untersucht worden. Es liegt als Transmembranprotein vor (19), hat Phagenrezeptorfunktionen (15,76) und ist in den Wirkungsmechanismus von Colicin L involviert (62). Außerdem ist dieses Protein in Kombination mit dem Lipoprotein der äußeren Membran an der Aufrechterhaltung der normalen Form der Bakterienzelle beteiligt (7) und kann als Vermittler der F- abhängigen Konju-

gation dienen (76). Die Aminosäuresequenz dieses Proteins ist bei E. coli K-12 bestimmt worden; sein Molekulargewicht wurde mit 35.159 angegeben (10).

Die Mobilität dieses Proteins bei der SDS- PAGE ist veränderbar: Nach Inkubation in Natrium- Dodecylsulfat (SDS) bei 100 °C beträgt das scheinbare Molekulargewicht ca. 36.000. Behandlung bei 37 °C (statt bei 100 °C) in SDS bewirkt eine Migration dieses Proteins im Gel, die der Migration eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 28.000 entspricht (74).

Um Verwandtschaften zwischen verschiedenen Bakterienstämmen immunologisch auf dem Niveau der Proteine ihrer äußeren Membran untersuchen zu können, wurden Anti- Protein- monoklonale Antikörper isoliert. Durch die gewählte Immunisierungsmethode es wurde mit LPS- armen Membran- Präparationen gearbeitet wurde versucht, eine Immunantwort gegen andere Oberflächenstrukturen als LPS zu induzieren. Es wurden zwei Hybridomas isoliert, die beide mit dem OmpA- Protein der äußeren Membran reagierten. Dies wurde mit Hilfe von Western Blots gezeigt (Abb. 13).

Da aus den beiden Immunisierungsexperimenten lediglich zwei Hybridoma- Zellkulturen hervorgingen, die monoklonale Antikörper mit einer Protein- Spezifität sezernierten, war die Art der Immunisierung offenbar nicht optimal. Neue Ergebnisse (P. van den Ley, Utrecht, Niederlande, pers. Mitteilung) zeigen, daß Anti- Protein- Antikörper an der Bindung an das entsprechende Protein durch langkettige LPS gehindert werden können. Da das zur Immunisierung verwendete Präparat immer noch erhebliche Mengen an O1 LPS enthielt, erscheint es denkbar, daß eine zur Immunantwort erforderliche Antikörperbindung an Membranproteine nicht in einem optimalen Umfang stattgefunden hat. Zur Isolierung von Anti- Membranprotein- monoklonalen Antikörpern sollte man daher entweder gereinigte Membranproteine oder Präparate benutzen, die frei von langkettigem LPS sind.

Vergleichende Untersuchungen einer Reihe von E. coli- Stämmen mit Western Blotting zeigten, daß diese beiden isolierten monoklonalen Antikörper 7306 und 8423 mit einem Protein reagierten, das in allen verwendeten Stämmen vorhanden war und das im Molekulargewichts- Bereich des OmpA Proteins lief (Abb. 13). Um den Nachweis zu führen daß die Antikörper tatsächlich mit dem OmpA- Protein reagieren, wurde die Hitzemodifizierbarkeit dieses Proteins ausgenutzt (Abb. 14). Beide Antikörper reagierten bei diesem Versuch mit dem hitzemodifizierbaren OmpA- Protein. Die Tatsache, daß die Antikörper das OmpA- Protein einer ganzen Reihe von Stämmen erkannten (Abb. 13), bedeutet, daß die OmpA- Proteine aller untersuchten Stämme mindestens eine identische antigene Determinante haben, die von den beiden isolierten monoklonalen Antikörpern erkannt wird. Eine solche ausgeprägte Kreuzreaktivität wurde schon von Overbeeke et al. beschrieben, die unter Benutzung von tierischen Antiseren starke Kreuzreaktionen zwischen dem OmpA- Protein von E. coli K-12 und dem entsprechenden Protein von 45 E. coli- Isolaten von Menschen fanden (62). Andere Arbeiten zeigten weiterhin, daß Membranproteine innerhalb der Enterobacteriaceae stark kreuzreagierend sind (29,30). Beide hier beschriebenen monoklonalen Antikörper scheinen ein Epitop auf dem OmpA- Protein zu erkennen, das bei allen untersuchten Vertretern der unterschiedlichen klonalen Gruppen vorhanden ist. Es ist daher denkbar, daß dieses Epitop an einer für eine Funktion des OmpA- Proteins wichtigen und daher konservativen Region lokalisiert ist. Keiner der beiden monoklonalen Antikörper reagierte jedoch mit nativem OmpA- Protein auf der Oberfläche von intakten Bakterien, wie mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz gezeigt werden konnte. Das Epitop, das diese beiden monoklonalen Antikörper erkennen, ist offenbar nicht exponiert, sondern möglicherweise in einem Transmembran-Teil des OmpA- Proteins lokalisiert.

Wegen der starken Kreuzreaktivität der Membranproteine wäre es nicht überraschend, wenn die beiden Anti- OmpA- monoklonalen Antikörper auch mit dem entsprechenden Protein anderer

Enterobacteriaceae reagieren würden.

Die Verwandtschaft von E. coli- Stämmen des O1- Serotyps wurde mit Hilfe verschiedener biochemischer Methoden untersucht (44, M. Achtman, pers. Mitteilung). Bei der Analyse des LPS von 65 E. coli- Stämmen des O1- Serotyps mit Hilfe einer SDS- PAGE konnten vier verschiedene Laufmuster (Abb. 6) unterschieden werden, die in folgender Häufigkeit auftraten: 33 Stämme hatten das O1A- LPS; dieses LPS ist als eine klonale Eigenschaft von O1- Bakterien- Stämmen anzusehen, die das Proteinmuster 9 haben; das LPS- Muster O1A1 ist dagegen mit Stämmen assoziiert, die das Membran- Proteinmuster 5 haben (Tabelle 1). 27 Stämme dieses Typs wurden gefunden.

Das O1A1- LPS läuft bei der SDS- PAGE als eine Serie von Doppelbanden; das O1A LPS als eine Reihe von Einzelbanden, die sich jeweils parallel zu der oberen der O1A1- Doppelbanden befanden. Fünf Stämme, die ebenfalls mit herkömmlichen polyklonalen Kaninchen- Seren dem O- Serotyp O1 zugeordnet worden waren, ließen sich in keinen dieser beiden Klone eingliedern. Das LPS von vier dieser letztgenannten Stämme unterschied sich auch im SDS- PAGE- Laufmuster von O1A und O1A1- LPS (Abb. 6). Dabei wurden zwei verschiedene Typen gefunden, die O1B und O1C genannt wurden.

Diese Unterschiede im Laufmuster konnten durch serologische Befunde unterstützt werden. Dazu wurden sowohl Kaninchenseren als auch monoklonale Antikörper benutzt.

Die beiden verwendeten Kaninchenseren waren gegen Vertreter des O1A1 und des O1A- Klons erzeugt worden. Unadsorbiert reagierten beide Seren stark mit O1A, O1A1, O1B und O1C- Stämmen (Abb. 20 und 21). Dies zeigt das Vorhandensein von gemeinsamen antigenen Determinanten bei allen vier O1- LPS- Typen an. Die Untersuchung des Spektrums an Kreuzreaktionen mit anderen Serotypen zeigte bei zwei bzw. drei der zwölf bekannten (60) mit dem O1- Serotyp kreuzreagierenden Bakterien einen nennenswer-

ten Agglutinationstiter (Tab. 5).

Der Unterschied im Reaktionsmusters mit dem kreuzreagierenden O148- Stamm bedeutet, daß das Anti O1A- (Einzelbanden-) Serum auch Antikörper gegen mindestens ein Epitop enthält, das nicht von dem Anti O1A1- (Doppelbanden-) Serum erkannt wird.

Auch bei Western Blot Experimenten mit diesen Seren konnte gezeigt werden, daß sie mit allen vier O1- LPS- Typen reagierten (Abb. 21). Bei diesen Versuchen zeigte es sich auch, daß die Anti- LPS- Aktivität der verwendeten Kaninchenseren fast ausschließlich in der IgM- Fraktion der Seren lag, da die verwendete Immunfärbemethode nur beim Einsatz eines Anti- IgM-Konjugats die Bindung der Antikörper an die Immunoblots im Bereich der langen Lipopolysaccharid- Ketten zeigen konnte. Die Immunfärbung der Blots unter Verwendung des IgG- spezifischen Konjugats zeigte nur recht schwache Reaktionen, die auf den Bereich der kurzen LPS- Ketten beschränkt waren. Dies deutet darauf hin, daß die Immunreaktion der Tiere zu einem großen Teil IgM spezifisch erfolgte. Dies erklärt zudem die starke Agglutinationsaktivität der Seren: Antikörper der IgM-Klasse sollen bis zu 750 mal effektiver bei der Agglutination sein als IgG Antikörper (55).

Um reproduzierbare Reagenzien für serologische Untersuchungen zur Verfügung zu haben, wurde eine Reihe von monoklonalen Antikörpern gegen das O1A und das O1A1- LPS isoliert. Im Gegensatz zu den unadsorbierten Immunseren erkannten die monoklonalen Antikörper LPS des Typs O1B bzw. O1C nicht. Bei einer Analyse der LPS- Typen O1A1 und O1A mit Hilfe eines Western Blot zeigte sich, daß alle isolierten monoklonalen Antikörper mit beiden Banden, die die O- Wiederholungseinheiten des O1A1 LPS darstellen und mit dem Einzelbandenmuster, das die O- Wiederholungseinheiten des O1A repräsentiert, reagieren.

Dieser Befund zeigt, daß das O1A1 und das O1A- LPS ein identisches Epitop besitzen und daß es dieses gemeinsame Epi-

top auf beiden Banden des als Doppelbande laufenden O1A1- LPS gibt. Weder O1B- noch O1C- LPS enthielten dieses Epitop. Die schwache Reaktion der Antikörper auf Western Blots liegt möglicherweise an einer niedrigen Avidität der Antikörper oder an den Versuchsbedingungen.

Wie durch Untersuchung von E. coli- Referenzstämmen festgestellt werden konnte, reagierten die monoklonalen Antikörper auch nicht mit anderen, kreuzreagierenden (60) O- Serotypen (3.3.3). Die serologischen Untersuchungen des O1- LPS mit Hilfe der isolierten monoklonalen Antikörper wurden auf verschiedenen methodologischen Ebenen durchgeführt: Die klassische Methode der Agglutination einer Suspension von gekochten Bakterien wurde mit einem Ratte X Ratte monoklonalen IgM- Antikörper durchgeführt. Sie ergab relativ niedrige, aber signifikante Titer und zeigte, daß dieser LPS- spezifische Antikörper nur Bakterien des O1A und O1A1- LPS- Typs agglutinierte.

Problematisch bei dieser Methode ist allgemein, daß man mit ganzen, mehrstündig gekochten Bakterien arbeiten muß, die eine Vielzahl von Antigenen haben, wodurch man bei Verwendung eines tierischen Antiserums nicht vollständig sicher sein kann, nur Anti- LPS- Antikörper zu messen. Hinzu kommt, daß manche Bakterienstämme durch die Hitzebehandlung so verändert werden, daß sie spontan agglutinieren, also ohne jeden Zusatz eines Antiserums (siehe dazu auch Tabelle 5).

Zum Nachweis einer spezifischen Antikörperbindung an Bakterien wurden ganze, hitzefixierte Bakterien mit Antikörpern und einem FITC (Fluorescein- Isothiocyanat)- markierten Konjugat behandelt. Dabei konnte gezeigt werden, daß die verwendeten Anti- LPS monoklonalen Antikörper an die gesamte Bakterienoberfläche binden konnten (Abb. 16). Da LPS die Bakterien-Oberfläche zu ca. 45% bedeckt (32), war diese Tatsache nicht unerwartet.

Um die Wirkung der Antikörperbindung an die Bakterien-

Oberfläche zu untersuchen, wurden lebende, nicht fixierte Bakterien mit affinitätschromatographisch gereinigten monoklonalen Anti- LPS- Antikörpern und Protein A- Gold behandelt. Dabei konnte gezeigt werden, daß auch bei dieser Methode nur Bakterien mit O1A und O1A1- LPS erkannt wurden und daß die Oberfläche dieser Bakterien offenbar durch die Antikörper-Protein A- Gold- Bindung verändert wurde (Abb.17). Die Antikörper- Bindung schien die Bakterien- Oberfläche "aufzureißen"; jedenfalls waren "Ausstülpungen" auf der Oberfläche der O1A oder O1A1- LPS tragenden Bakterien zu erkennen, die mit Goldpartikeln bedeckt waren.

Man kann davon ausgehen, daß die Antikörper, die von Hybridoma- Kulturen sezerniert werden, einen kleinen Ausschnitt der Antikörperpopulation in einem immunisierten Tier darstellen. Die Antikörperzusammensetzung in einem Serum kann zeitlich stark variieren. Die Eigenschaften von Antikörpern, die von Hybridoma- Zelle synthetisiert werden, bleiben dagegen konstant. Wenn man davon ausgeht, daß nur 1- 3% der Antikörper in konventionellen Antiseren solche mit hoher Avidität für das eingesetzte Antigen sind (59), kann man eine ähnliche Verteilung bei verschiedenen Hybridoma- Kulturen annehmen. Außerdem ist bekannt, daß der am häufigsten für die Identifizierung von positiven Klonen eingesetzte Test (ELISA) Antikörper schwächerer Avidität ebenso wie solche höherer Avidität erkennt (66). Allgemein ist bekannt, daß viele monoklonale Antikörper nur für bestimmte Testverfahren besonders geeignet sind (26). Ähnliche Phänomene könnten bei der begrenzten Verwendbarkeit der isclierten Maus X Maus monoklonalen Antikörper für die Agglutination eine Rolle spielen. Der Hauptgrund für die gute Eignung der Immunseren für die Agglutination dürfte in der Art der Immunisierung liegen: Bei multipler i.v. Injektion von LPS werden sehr hohe Titer von LPS- spezifischem IgM erreicht (18).

Auffällig war die Immunglobulin- G Subklassenspezifische Immunreaktion der Mäuse auf die Immunisierung mit LPS- enthal-

tenden Membranvesikeln: von den acht LPS- spezifischen monoklonalen Antikörpern, die aus drei unabhängigen Fusionen isoliert wurden, gehörten sieben der Immunglobulin- Subklasse IgG3 an. Antikörper dieser Subklasse stellen aber nur ca. 2% der Serum- IgG's (86). Möglicherweise ist diese Subklassen-Restriktion der Immunantwort auf hauptsächlich eine Immunglobulin- Subklasse Antigen- spezifisch; andere Autoren fanden in der Maus anti- LPS- Antikörper ebenfalls im IgG3- Anteil des Serums bzw. isolierten monoklonale Antikörper, die dieser Subklasse angehörten (12,42,85).

Bei der Untersuchung der O1- Bakterien mit adsorbierten Kaninchenseren konnte festgestellt werden, daß die Adsorption eines der beiden Seren mit Bakterien mit dem O1B oder dem O1C-LPS spezifische Seren ergab, die mit Bakterien des O1A1 und des O1A- Serotyps reagierten, aber nicht mehr mit solchen, die O1B- oder O1C- LPS besaßen. Die Antikörper- Titer gegen die untersuchten kreuzreagierenden Stämme blieben nach einer solchen Behandlung allerdings unverändert hoch (Abb. 20). Diese so adsorbierten Seren besaßen somit die gleich Spezifität wie die monoklonalen Antikörper.

Die Existenz dieser beiden bakteriellen Klone wurden vor kurzem in der DDR durch eine Arbeit von Nimmich et al. (56) bestätigt, der den Typ der Fimbrien, O- Antigen- Faktoren, Phagensensitivität und Fermentationseigenschaften untersuchte. Dabei konnte er den Fimbrien- Typ als klonales Merkmal erkennen: Die meisten O1:K1- Stämme mit dem H- Serotyp 7 besitzen F11- Fimbrien, die O1:K1- Bakterien, die H^- sind und die nach seiner Nomenklatur einen zusätzlichen O- Faktor tragen, haben meistens den F9- Fimbrien- Typ. Es liegt nahe zu vermuten, daß die erstgenannte Gruppe zu dem Klon mit Membranprotein- Muster 9 und die zweite Gruppe zu dem Klon mit Membranprotein-Muster 5 gehört (Tabelle 1). Beweise dafür liegen jedoch nicht vor.

Um die Frage zu beantworten, ob die bei dem O1A1- LPS bei

der SDS- PAGE zu beobachtende Extra- Bande, die nicht parallel mit dem Muster des O1A- LPS läuft, eine zusätzliche antigenische Determinante hat, wurde versucht, monoklonale Antikörper dagegen zu isolieren, da die vorhandenen Maus X Maus monoklonalen Antikörper beide Banden erkannten.

Für diesen Versuch wurden Ratt X Ratte monoklonale Antikörper isoliert. Diese haben eine Reihe von Vorzügen. Im Verlauf der Isolierung der Maus X Maus monoklonalen Antikörper mußte festgestellt werden, daß relativ viele Hybridomas, die Antikörper interessanter Spezifität produzierten, instabil waren, d.h. die Antikörperproduktion relativ bald nach einer Fusion spontan und irreversibel einstellten. Dieses Phänomen tritt mit einer Häufigkeit von ca. 10^{-3}/Zelle/Generation auf (13). Im Verlauf dieser Arbeit wurde von Clark et al. (11) 1983 gezeigt, daß Ratte X Ratte -Hybridomas erheblich stabiler sind. Ein weiterer potentieller Vorteil bei der Verwendung von Ratte X Ratte- Hybridomas liegt darin, daß aus einem Tier nach Inokulation von ausreichenden Mengen von Hybridoma- Zellen bis zu 30 ml Ascites- Flüssigkeit gewonnen werden können (Maus: max. 5 ml).

Aus diesem Experiment konnten zwei stabile Hybridomas isoliert werden, die LPS- spezifisch waren. Ein isolierter monoklonaler Ratten- Antikörper gehörte zur IgM- Klasse und konnte auch zur Untersuchung von Bakterien mittels Agglutination verwendet werden (siehe Abb. 15). Western Blot Experimente unter Verwendung der beiden isolierten Ratten- Hybridomas zeigten, daß diese nicht die gewünschte O1A1- Spezifität hatten. Diese Tatsache wird verständlich, wenn man folgende Überlegungen berücksichtigt: Die Wahrscheinlichkeit, einen Hybridoma- Zellklon zu isolieren, der Antikörper gegen eine "minor determinant" sezerniert, ist relativ gering, da man nur eine relativ kleine Anzahl an Hybridomas erwartet, die überhaupt eine Reaktion mit dem eingesetzten Antigen zeigt. Wenn man nur zwei monoklonale Antikörper aus einer Fusion isoliert, hat man nur eine geringe Aussicht, daß einer davon gerade diese Spezifität

hat. Wie viele O1A1- spezifische monoklonale Antikörper müßte man isolieren, um einen mit exklusiver Spezifität für das O1A1 LPS (und nicht für das O1A LPS) zu erhalten?

Wenn man die Agglutinations- Titer des Anti- O1A1- Kaninchen- Serums vor und nach Adsorption mit O1A- Bakterien betrachtet (Abb.20), so ist ein Anti- O1A1- Titer von 1:800 nach Adsorption übriggeblieben, der ein Achtel der Gesamtaktivität (vor Adsorption) darstellt. Dies zeigt, daß ca. 10% der Antikörper dieses Serums O1A1- spezifisch sind. Man könnte daher in Analogie dazu vermuten, daß einer von zehn O1A1- spezifischen monoklonalen Antikörpern nur mit diesem LPS reagiert. Da die Isolierung von monoklonalen Antikörpern jedoch ein multifaktorielles Experiment darstellt, sind genaue Voraussagen nicht möglich.

Um die Antigenität der Extra- Bande des O1A1- LPS zu untersuchen, wurde ein Western Blot mit einem anti O1A1- Serum, das mit einem O1A- Stamm adsorbiert worden war, behandelt. Nach dieser Adsorption war keine Reaktion mit O1A, O1B und O1C- LPS mehr festzustellen; mit dem O1A1 LPS war jedoch noch eine partielle Reaktion festzustellen (Abb. 21). Nur eine der beiden Banden dieses bei der SDS- PAGE als Doppelbandenmuster aufgetrennten LPS wurde von diesem adsorbierten Antiserum immunologisch angefärbt. Es konnte gezeigt werden, daß diese Bande nicht die zwischen dem O1A und dem O1A1- LPS gemeinsame Bande ist.

Somit konnte diese Extra- Bande als Träger einer "minor antigenic determinant" dargestellt werden. Möglicherweise entspricht diese Bande dem zusätlichen O- Faktor, den Nimmich in der Bakteriengruppe ohne H- Antigen findet (57).

Die Reaktion dieses adsorbierten Serums mit dieser Extra-Bande war jedoch wesentlich schwächer als die Reaktion des nicht adsorbierten Serums. Das deutet darauf hin, daß nur ein Teil der Antikörper, die bei dem Immunoblot unter Verwendung

des nicht adsorbierten Serums mit dieser Extra- Bande reagiert haben, spezifisch gegen diese "minor antigenic determinant" gerichtet sind. Ein Vergleich mit den Agglutinationsdaten, die mit diesem adsorbierten Serum erhalten wurden zeigt, daß die Reaktion mit dieser Extra- Determinante des O1A1- LPS mit einem Agglutinationstiter bei der Agglutination von Bakterien mit O1A1- LPS von 1:800 korrespondiert (Abb. 20) (unadsorbiert 1:6.400).

Unpublizierte Ergebnisse chemischer und chemo- physikalischer Untersuchungen (pers. Mitteilung von B. und K. Jann, Freiburg; Manuskript in Vorbereitung) der vier gefundenen Typen des O1- LPS sind in guter Übereinstimmung mit diesen serologischen Befunden: Aus Tabelle 6 geht hervor, daß alle untersuchten LPS über eine Pentasaccharid- Wiederholungseinheit verfügen. LPS des O1B bzw. O1C- Typs unterscheiden sich in der

Gruppe	N- Acetylglucosamin	Rhamnose	Galactose
O1B	2	2	1
O1C	2	2	1
O1A1	2	3	-
O1A	2	3	-

Tabelle 6: Zusammensetzung der Polysaccharid- Wiederholungseinheit der verschiedenen Typen der O1- LPS- Gruppe (Monosaccharid- Moleküle pro Wiederholungseinheit).

Zucker- Zusammensetzung von dem O1A1 bzw. O1A- LPS. Untersuchungen von ^{1}H- und ^{13}C- Kernmagnetresonanz- Spektren dieser vier Polysaccharide zeigten, daß sich O1B- und O1C- Polysaccharide in der Verknüpfung der Zuckermoleküle unterscheiden. Auch zwischen dem O1A1 und dem O1A Polysaccharid bestanden kleine Unterschiede (B. und K. Jann, unpublizierte Ergebnisse). Diese Ergebnisse bestätigten die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse einer serologischen Analyse des O1- Lipopolysaccharids. Sie rechtfertigen auch die Nomenklatur: die O1B und O1C- Polysaccharide unterscheiden sich in der Zuckerzusammensetzung von O1A und O1A1- Polysacchariden. Die chemischen Unterschiede zwischen O1A und O1A1 schlugen sich in dem Vorhandensein einer zusätzlichen antigenen Determinante bei dem O1A1 LPS nieder.

Die Natur des Phänomens, daß das O1A1 LPS bei der SDS- PAGE als eine Reihe von Doppelbanden läuft, ist bis jetzt unverstanden. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, daß diese Bakterien zwei verschiedene, strukturell im Teil der O-Wiederholungseinheiten leicht unterschiedliche Lipopolysaccharide synthetisieren. In diesem Fall wäre es jedoch wahrscheinlich, daß die beiden Banden eines solchen "Doppelbanden- LPS" sich mit fortschreitender Mobilität im SDS- Polyacrylamid- Gel weiter voneinander entfernen würden. Eine weitere, Möglichkeit wäre, daß solche Bakterien zwei verschiedene Typen der Lipid A- Core- Region haben. Dagegen spricht die Inhibierbarkeit der Bindung von Anti O1A1- Antikörpern an das O1A1- LPS, wenn dem Testansatz eine Polysaccharid- Präparation zugesetzt wurde, die von dem O1A1- Lipopolysaccharid isoliert worden war und also keine Lipid A- Core- Bestandteile mehr enthielt (Abb. 22). Diese Inhibition war O1A1- Polysaccharid- spezifisch; Zugabe von O1A- Polysaccharid hatte nur einen geringfügigen Effekt. Diese Inhibierbarkeit betraf nur Antikörper der IgG-Klasse; die IgM- Antikörper konnten bei den verfügbaren Polysaccharid- Konzentrationen nicht an der Bindung inhibiert werden. Ein Erklärungsmöglichkeit liegt in der unterschiedlichen Struktur von IgG und IgM; die letztere Immunglobulin- Klasse

hat fünfmal mehr Bindungsvalenzen als IgG- Moleküle, was eine höhere Konzentration erforderlich machen dürfte, um eine vollständige Inhibition der Bindung aller zehn Antigen- bindenden Stellen des Moleküls zu erreichen.

Die Isolierung von monoklonalen anti- LPS- Antikörpern an Stelle von herkömmlich erzeugten Immunseren zu vergleichenden Untersuchungen bietet eine Reihe von Vorteilen. Tierische Antiseren können mit vergleichsweise wenig Aufwand gewonnen werden, haben aber den Nachteil, daß sie nur limitiert verfügbar sind. Monoklonale Antikörper lassen sich dagegen in (theoretisch) unbegrenzten Mengen erzeugen. Häufig müssen tierische Antiseren adsorbiert werden, um spezifische Untersuchungen zu ermöglichen. Hybridomas erkennen nur je eine einzige antigene Determinante und müssen somit nicht adsorbiert werden. Dies fällt besonders positiv ins Gewicht, wenn man an die Vielzahl der bekannten Kreuzreaktionen denkt, die für anti- O- Seren beschrieben sind (60). Im Fall des O1- LPS sind Kreuzreaktionen mit 12 verschiedenen O- Serotypen bekannt, so daß man im ungünstigsten Falle eine große Zahl von Adsorptionen durchführen müßte, um zu monospezifischen Seren zu gelangen. Die reproduzierbare Verfügbarkeit von monoklonalen Antikörpern prädestiniert sie zur Verwendung als Standart- Reagenzien, z. B. in Referenz- Laboratorien, die bisher noch mit herkömmlich erzeugten (und z. T. adsorbierten) Antiseren zur Serotyp- Bestimmung arbeiten. Für den O1- Serotyp wäre der Maus X Maus monoklonale Antikörper 8409 empfehlenswert. Diese Hybridoma-Kultur wächst schnell und läßt sich gut zur Gewinnung von hochtitriger Ascites- Flüssigkeit heranziehen. Zur Zeit existieren mehr als 20 ml Ascites- Flüssigkeit und ca. 7 mg affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper, die zur Verfügung stehen.

Starke Unterschiede in der Zusammensetzung von Immunseren, die von verschiedenen Tieren gewonnen werden, machen es schwer, die Ergebnisse verschiedener Laboratorien miteinander zu vergleichen. Andererseits haben herkömmliche Antiseren au-

ßer der leichteren Verfügbarkeit den Vorteil, daß man eine Chance hat, Antikörper gegen "minor antigenic determinants" in einem solchen Serum zu haben. Entsprechende monoklonale Antikörper lassen sich zwar ebenfalls isolieren, doch können solche Versuche recht langwierig sein.

Die Tatsache, daß innerhalb eines O- Serotyps mehrere LPS-Species gefunden wurden, zeigt, daß die bisher übliche O- Serologie nicht die gewünschte Trennschärfe besitzt, um sie für genauere Untersuchungen heranziehen zu können. Auch bei Verwendung von adsorbierten Seren konnte man nie sicher sein, wirklich immer diegleiche Molekülspecies zu identifizieren. Der kombinierte Einsatz von monoklonalen Antikörpern und der SDS- PAGE von LPS bietet zumindest für Forschungszwecke einen gangbaren Weg, um zu eindeutigen und reproduzierbaren Befunden bei der O- Serologie zu gelangen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden dreißig verschiedene Bakterienstämme untersucht, die dem O1- Serotyp zugeordnet werden. Die meisten dieser Isolate gehörten einem von zwei verschiedenen bakteriellen Klonen an, die sich voneinander in sehr vielen Eigenschaften unterschieden. Jeder einzelne Klon zeigte jedoch sehr große interne Homogenität. Mit Hilfe einer SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophrese konnten innerhalb dieser Sammlung vier verschiedene Laufmuster des LPS festgestellt werden. Diese LPS- Typen wurden O1A, O1A1, O1B und O1C genannt. Die Bakterien des einen Klons hatten stets das O1A- LPS, die Vertreter des anderen Klons das O1A1- LPS. Vier O1- E. coli- Stämme hatten entweder das O1B oder das O1C- LPS. Das Laufmuster des O1A1- LPS unterschied sich von dem des O1A- LPS dadurch, daß das O1A1- LPS stets als eine Serie von Doppelbanden lief. Eine dieser beiden Banden hatte identische Laufeigenschaften wie das Laufmuster des O1A- LPS.

Es wurden monoklonale Antikörper gegen Vertreter beider Klone isoliert. Außerdem wurden zwei Anti- Protein monoklonale Antikörper isoliert. Mit Hilfe dieser monoklonalen Maus X Maus Antikörpern, die gegen das OmpA- Protein der äußeren Membran gerichtet waren, wurde versucht, Verwandtschaften zwischen verschiedenen E. coli- Stämmen zu definieren. Die beiden monoklonalen Antikörper reagierten auf Western Blots mit dem OmpA- Protein von allen untersuchten Stämmen, auch Vertretern der beiden O1- Klone, und konnten daher nicht zu einer vergleichenden Analyse herangezogen werden.

Es wurden acht Maus X Maus und zwei Ratte X Ratte monoklonale Antikörper isoliert, die spezifisch mit dem O1A und dem O1A1- LPS reagierten und die keine Reaktion mit dem O1B bzw. dem O1C LPS zeigten. Auch kreuzreagierende O- Serotypen wurden nicht erkannt. Dies wurde mit Agglutination, ELISA, Immunfluoreszenz, Immunogold- Elektronenmikroskopie und Western

Blotting gezeigt. Die Reaktivität der isolierten monoklonalen Antikörper war spezifisch gegen die O- Wiederholungseinheiten gerichtet; der Lipid A- Core- Teil des LPS wurde nicht erkannt.

Je ein Kaninchen- Immunserum gegen das O1A und das O1A1- LPS wurden zur Agglutination verwendet. Sie reagierten mit Bakterien aller vier O1- LPS- Typen und mit zwei bzw. drei kreuzreagierenden Serotypen mit Titern bis zu 1:12.800. Nach Adsorption mit Bakterien mit O1B bzw. O1C- LPS reagierten diese Seren spezifisch mit O1A und O1A1- Bakterien, aber auch noch z.T. mit kreuzreagierenden O117 bzw. O148- E. coli. Das Serum, das gegen den E. coli- Stamm mit O1A1- LPS hergestellt wurde, agglutinierte nach Adsorption mit O1A- Bakterien nur noch O1A1- E. coli.

Mit einer Immunoblot- Methode konnte gezeigt werden, daß die unadsorbieten Kaninchen- Antiseren bei dieser Methode mit allen vier O1- LPS- Typen reagierten, was in Übereinstimmung mit den Agglutinationsdaten ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Immunseren Anti- LPS- Antikörper haupsächlich in der IgM- Frakton des Serums besaßen. Das Anti- O1A1- Antiserum reagierte nach Adsorption mit O1A- Bakterien auf einem solchen Immunoblot nur noch mit dem O1A1- LPS. Dabei wurde nur die unterste Bande dieses als Doppelbanden- Muster laufenden LPS angefärbt. Diese Bande konnte als Träger einer zusätzlichen "minor antigenic determinant" identifiziert werden.

Es wurde ein Inhibitions- O1A1- LPS- ELISA mit Anti O1A1 Serum durchgeführt, das mit O1A- Bakterien adsorbiert worden war. Zum Inhibieren wurden Polysaccharide verwendet, die aus dem O1A und dem O1A1- LPS isoliert wurden. Es konnte gezeigt werden, daß die zusätzliche antigene Determinante des O1A1- LPS im Polysaccharid- Teil dieses LPS lokalisiert ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu einer klareren Definition der O- Serologie der Gruppe der O1- E. coli.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Achtman,M., Mercer,A, Kusećek,B., Pohl,A, Heuzenroeder,M., Aaronson,W. Sutton,A., and Silver,R.P. 1983. Six widespread bacterial clones among Escherichia coli K1 isolates. Infect. Immun.39, 315-335.

2. Bastin, J.M., Kirkley, J., and McMichael, A.J. 1982. Production of monoclonal antibodies: a practical guide. in: Monoclonal antibodies in clinical medicine. Academic Press, London.

3. Bazin, H. 1982. Production of rat monoclonal antibodies with the LOU rat non secreting IR983F myeloma cell line. in: Protides of the biological fluids. Pergamon press, Oxford.

4. Berk, S.L., and McCabe, W.R. 1980. Meningitis caused by gram-negativ bacilli. Ann Int. Med 93, 253-260.

5. Blake, M.S., Johnson, K.H., Russell-Jones, G., and Gotschlich, E.C. 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase- conjugated anti-antibody on western blots. Anal. Biochem. 136, 175-179.

6. Bosworth, J.M., Brimfield, A.A., Naylor, J.A., and Hunter, K.W. 1983. Measurement of monoclonal antibody concentrations in hybridoma cultures: comparision of competetive inhibition and antigen capture enzyme immunoassay. J. Immunol. Met. 62, 331-336.

7. Braun, V. 1975. Covalent lipoprotein from the outer membrane of Escherichia coli. Biochem. Biophys. Acta 415, 335-337.

8. Brumfitt, W., and Arscher,A.W. (Eds.) 1973. Urinary tract infection. Oxford University Press, London.

9. Chai, T., and Foulds, J. 1974. Demonstration of a missing outer membrane protein in tolG mutants of Escherichia coli. J. Mol. Biol. 85, 465-474.

10. Chen, R., Schmidmayr, W., Krämer, C., Chen- Schmeisser, U., and Henning, U. 1980. Primary structure of major outer membrane protein II* (Omp A protein) of Escherichia coli K- 12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4592-4596.

11. Clark, M., Cobbold, S., Hale, G., and Waldmann, H. 1983. Advantages of rat monoclonal antibodies. Immunology today 4, 100-101.

12. Colwell, D.E., Michalek, S.M., Briles, D.E., Jirillo, E., and McGhee, J.R. 1984. Monoclonal antibodies to Salmonella lipopolysaccharide: anti O- polysaccharide antibodies protect C3H mice against challenge with virulent Salmonella typhimurium. J. Immunol. 133, 950-957.

13. Cotton, R.G.H., Secher, D.S., and Milstein, C. 1973. Somatic mutation and the origin of antibody diversity. Clonal variability of the immunoglobulin produced by MOPC 21 cells in culture. Eur. J. Immunol. 3, 135-140.

14. Crichton, P.B., and Old, D.C. 1979. Biotyping of Escherichia coli. J. Med. Microbiol. 12, 473-486.

15. Datta, D.B., Arden, B., and Henning, U. 1977. Major proteins of the Escherichia coli outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. J. Bacteriol. 131, 821-829.

16. DeMey, J. 1983. Colloidal Gold probes in immunocytochemistry. In: Immunocytochemistry. Wright, Bristol.

17. Donner, P., Greiser-Wilke, I., and Moelling, K. 1982. Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene product of avian myelocytomattosis virus. Nature 296, 262-266.

18. Edwards, P.R., and Ewing, W.H. 1972. Identification of Enterobacteriaceae 3rd ed. Burgess Publication Co. Minneapolis, Minn.

19. Endermann, R., Krämer, C., and Henning, U. 1978. Major proteins of Escherichia coli K-12: Evidence for protei II* being a transmembrane protein. FEBS letters 86, 21-24.

20. Fazekas de St Groth, S., and Scheidegger, D. 1980. Production of monoclonal antibodies: strategies and tactics. J. Immunol. Met. 35, 1-21.

21. Frasch, C.E., McNelis, R.M., and Gotschlich, E.C. 1976. Strain- specific variation in the protein and lipopolysaccharid composition of the group B meningococcal outer membrane. J. Bacteriol. 127, 973-981.

22. Freund, J., and McDermont, K. 1942. Sensitation to horse serum by means of adjuvants. Proc. Soc. Exper. Biol. 49, 548-556.

23. Gianella, R.A. 1981. Pathogenesis of acute bacterial diarrheal disorders. Ann. Rev. Med. 32, 341-347.

24. Gillis,T.P., and Buchanan, T.M. 1982. Production and partial characterization of monoclonal antibodies to Mycobacterium leprae. Infect. Immun. 37, 172-178.

25. Goldman, R.C., and Leive, L. 1980. Heterogeneity of antigenic- side- chain length in lipopolysaccharide from Escherichia coli O111 and Salmonella typhimurium LT. Eur. J. Biochem. 107, 145-153.

26. Haaijman, J.J., Deen, C., Kröse, C.J.M., Zijlstra, J.J., Coolen, J., and Radl, J. A jugle full of pitfalls. Immunol. today 5, 56-58.

27. Hancock, R.E.W., Wieczorek, A.A., Mutharia, L.M., Poole, K. 1982. Monoclonal antibodies against Pseudomonas aeruginosa outer membrane antigens: isolation and characterization. Infect. Immun. 37, 166-171.

28. Heuzenroeder, M., Kusećek, B., Ochman, H., Selander, R.K., Väisanen-Rhen, V., Korhonen, T., Stuart, S., Achtman, M. 1985. Clonal Nature of O2:K1 Escherichia coli isolated from diseased humans and chickens. submitted to Infect. Immun.

29. Hofstra,H. ,and Dankert, J. 1979. Antigenic cross-ractivity of major outer membrane proteins in Enterobacteriaceae species. J. Gen. Microbiol. 111, 293-302.

30. Hofstra,H. ,and Dankert, J. 1980. Major outer membrane proteins: common antigens in Enterobacteriaceae species. J. Gen. Microbiol. 119, 123-131.

31. Hoogenraad, N., Helman, T., and Hoogenraad, J. 1983. The effect of pre- injection of mice with Pristane on ascites tumour formation and monoclonal antibody production. J. Immunol. Meth. 61, 317-320.

32. Inoue, M. 1979. Bacterial outer membranes. John Wiley & Sons, Inc., New York.

33. Iscove, N.N., and Schreier, M.H. 1979. Clonal groth of cells in semisolid or viscous medium. In: Immunological Methods. Academic Press, New York.

34. Ito, J.I., Wunderlich, A.C., Lyons, J., Davis, C.E., Guiney, D.G., and Braude, A.I. 1980. Role of Magnesium in the enzyme- linked immunosorbent assay for lipopolysaccharides of rough Escherichia coli strain J5 and Neisseria gonorrhoeae. J. Infect. Dis. 142, 532-537.

35. Jann, K., and Jann, B. 1983. The K antigens in Escherichia coli. in: Prog. Allergy, Karger, Basel.33, 53-79.

36. Johnson, G.D., Holborow, E.J., and Dorling, J. 1978. Immunofluorescence and immunoenzyme techniques. In: Handbook of experimental immunolgy. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

37. Kaijser, B. 1973. Immunology of Escherichia coli: K antigen and its relation to urinary-tract infection. J. Infect. Dis. 127: 670-677.

38. Kauffmann, M.D. 1975. Classification of bacteria. Munksgaard, Copenhagen

39. Kearney, J.F.,Radbruch, A.,Liesegang, B., and Rajewsky, K. 1979. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody secreting hybrid cell lines. J.Immunol.123,1548

40. Keller, R. 1981. Immunologie und Immunpathologie. Thieme Verlag, Stuttgart.

41. Kennett, R.H. 1980. Fusion protocols. In: Monoclonal antibodies. Plenum Press, New York.

42. Kirkland, T.N., and Ziegler, E.J. 1984. An immunoprotective monoclonal antibody to lipopolysaccharide. J. Immunol. 132, 2590-2592.

43. Köhler,G., and Milstein,C. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. Nature (London) 256, 495-497.

44. Kusećek, B., Wloch, H., Mercer, A., Vaisänen, V., Pluschke, G. Korhonen, T., and Achtman, M. 1984. Lipopolysaccharide, capsule and fimbriae as virulence factors among O1, O7, O16, O18 or O75 and K1, K5 or K100 Escherichia coli. Infect. Immun. 43, 368-379.

45. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227: 680-685.

46. Lindmark, R., Thoren- Tolling, K., and Sjöquist, J. 1983. Binding of immunoglobulins to protein A and Immunoglobulin levels in mammalian sera. J. Immunol. Meth. 62, 1-13.

47. Littlefield, J.W. 1964. Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science 145, 709-712.

48. Lo, M.M.S., Tsong, T.Y., Conrad, M.K., Strittmatter, S.M., Hester, L.D., and Snyder, S.H. 1984. Monoclonal antibody production by receptor- mediated electrically induced cell fusion. Nature (London) 310, 792-794.

49. Lüderitz, O., Tanamoto, K-I., Galanos, C., Westphal, O., Zähringer, U., Rietschel, E.T., Kusumoto, S., and Shiba, T. 1983. Structural principles of lipopolysaccharides and biological properties of synthetic partial structures. In: Bacterial Lipopolysaccharides, American Chemical Society, Washington D.C.

50. Lutgenberg, B., Meijers, J., Peters, R, van der Hoek, P., and van Alphen, L. 1975. Electrophoretic resolution of the 'major outer membrane protein' of Escherichia coli K-12 into four bands. FEBS Lett. 58: 254-258.

51. Mackenzie, M.R., Warner, N.L., and Mitchell, G.F. 1978. The binding of murine immunoglobulins to staphylococcal Protein A. J. Immunol. 120, 1493-1496.

52. McCabe, W.R., Kaijser, B., Olling, S. Uwadah, H., and Hanson, L.A. 1978. Escherichia coli in in bacteremia: K and O antigens and serum sensitivity of strains from adults and neonates. J. Infect. Dis.138: 33-41.

53. McConnell, I., Munro, A., and Waldmann, H. 1981. The immune system. Blackwell Scientific, Oxford.

54. Mitchison, D.A., and Coates, A.R.M. 1982. Monoclonal antibodies in bacteriogy. in: Monoclonal antibodies in clinical medicine. Academic Press, London.

55. Nichols, S.W., and Nakamura, R.M. 1980. Agglutination and agglutination inhibition assays. In: Manual of Clinical Immunology, ASM, Washington.

56. Nimmich, W., und Zingler, G. 1984a. Beziehungen zwischen O:K:H- Serotyp und Fimbrien- Antigen bei E. coli von Harnwegsinfektionen. Z. Uro. u. Nephrol. 78, 343-349.

57. Nimmich, W., und Zingler, G. 1984b. Biochemical characteristics, phage patterns, and O1 factor analysis of Escherichia coli O1:K1:H7:F11 and O1:K1:H^{-}:F9 strains isolated from patients with urinary tract infections. Med. Microbiol. Immunol. 173, 75-85.

58. Ochman, H., and Selander, R.K. 1984. Evidence for clonal population structure in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 198-201.

59. Olsson, L. 1982. Monoclonal antibodies in clinical immunbiology. Allergy 38, 145-154.

60. Ørskov,I., Ørskov,F. Jann,B. and Jann,K. 1977. Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of Escherichia coli. Bacteriol. Rev. 41: 667-710.

61. Ørskov,I., Ørskov, F. 1983. Serology of Escherichia coli fimbriae. in: Prog. Allergy, Karger, Basel.33, 80-105.

62. Overbeeke, N., and Lugtenberg, B. 1980. Major outer membrane proteins of Escherichia coli Strains of human origin. J. Gen. Microbiol. 121, 373-380.

63. Ouchterlony,Ö. in: Handbook of experimental immunology. 1978. Blackwell scientific publications, Oxford.

64. Paakkanen, J. Gotschlich, E., and Mäkelä, P.H. 1979. Protein K: a new outer membrane protein found in encapsulated Escherichia coli. J. Bacteriol. 139, 835-841.
65. Paul, J. 1980. in: Zell- und Gewebekultur. De Gruyter Verlag, Berlin.

66. Peterfy, F., Kuusela, P., and Mäkela, O. 1983. Affinity requirements for antibody assays mapped by monoclonal antibodies. J. Immunol. 130, 1809-1813.

67. Pluschke, G. and M. Achtman. 1984. Degree of antibody-independent activation of the classical complement pathway by K1 Escherichia coli differs with O antigen type and correlates with virulence in newborn meningitis. Infect. Immun. 43, 684-692.

68. Pluschke, G., A. Mercer, B. Kusećek, A. Pohl and M. Achtman. 1983. The induction of bacteremia in newborn rats by Escherichia coli K1 is correlated with only certain O (lipopolysaccharide) antigens. Infect. Immun. 39: 599-608.

69. Putnam, F.W. 1957. Aberrations of protein metabolism in multiple myeloma. Physiol. Rev. 37, 512-538.

70. Rinno, J., Golecki, J.R., and Mayer., H. 1980. Localization of enterobacterial common antigen: immunogenic and nonimmunogenic enterobacterial common antigen- containing Escherichia coli. J. Bacteriol. 141, 814-821.

71. Robbins, J.B., McCracken, G.H., Gotschlich, E.C., Ørskov, F., Ørskov, I., and Hanson, L.A. 1974. Escherichia coli K1 capsular polysaccharide associated with neonatal meningitis. N. Engl. J. Med 290, 1216-1220.

72. Sarff, L.D., McCracken, G.H., Schiffer, M.P., Glode, M.P., Robbins, J.B., Ørskov, I., and Ørskov, F. 1975. Epidemiology of Escherichia coli K1 in healthy and diseased newborns. Lancet i: 1099-1104.

73. Scharff, M.D., Roberts, S., and Thammana, P. 1981. Monoclonal antibodies. J. Infect. Dis. 143, 346-351.

74. Schweizer, M., Hindenach, I., Garten, W., and Henning, U. 1978. Major Proteins of the Escherichia coli outer cell envelope membrane. interaction of protein II* with lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem. 82, 211-217.

75. Selander, R.K., and Levine, B.R. 1980. Genetic diversity and structure in populations of Escherichia coli. Science 210, 545-547.

76. Skurray, R.A., Hancock, R.E.W., and Reeves, P. 1974. Con$^-$ mutants: class of mutants in Escherichia coli K-12 lacking a major outer cell wall protein and defective in conjugation and adsorption of a bacteriophage. J. Bacteriol. 119, 726-735.

77. Spector, T. 1978. Refinenment of the Coomassie Blue method of protein quantitation. Anal. Biochem. 86, 142-146. 78. Sugasawara, R.J., Prato, C.M., and Sippel, J.E. 1984. Enzyme- linked immunosorbent assay with a monoclonal antibody for detecting group A meningococcal antigens in cerebospinal fluid. J. Clin. Microbiol. 19, 230-234.

79. Towbin, H., Stahelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.

80. Tsai, C.-M., and C.E. Frasch. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 119: 115-119.

81. Ulisko, I.N., Andronova, N.I. 1982. Partial composition of O- antigens in Escherichia coli of some O- groups. J. Microbiol. Epidemiol. Immunol. 6: 40-44.

82. Vaisänen,V., Tallgren,L.G., Mäkelä, P.H., Källenius, G., Hultberg, H.. Elo, J., Siitonen, A., Svanborg-Eden,C, Svenson, S.B., and Korhonen, T. 1981. Mannose-resistant haemagglutination and p antigen recognition are characteristic of Escherichia coli causing primary pyelonephritis. Lancetii: 1366-1369.

83. Van Alphen, L., Havekes, L., and Lutgenberg, B. 1977. Major outer membrane protein d of Escherichia coli K-12. FEBS Letters 75, 285-290.

84. Voller, A., Bidwell, D.E., and Bartlett, A. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Dynatech Europe, Guernsey, G.B.

85. Watanabe, M., Ishii, T., and Nariushi, H. 1981. Fractionation of IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b} and IgG_3 immunoglobulins from mouse serum by protein A- Sepharose column chromatography. Japan J. Exp. Med. 51, 65-70.

86. Weir, D.M. 1978. Handbook of experimental immunology. Blackwell Scientific, Oxford.

87. Westphal, O., and Jann, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides. Methods Carbohydrate Chem.5: 83-91.

88. Yelton, D.E., Margulies, D.H., Diamond, B., and Scharff, M.D. 1980. Plasmacytomas and hybridomas. In: Monoclonal antibodies, Plenum Press, New York.

89. Zingler, G., Nimmich, W., Naumann, G., Falkenhagen, U., Straube, E., Ulisko, I.N.,Ratiner, Y.A., and Golubeva, I.V. 1984. O- Antigenfaktoren bei Escherichia coli O1-Stämmen von Patienten mit Harnwegsinfektionen. Z. Gesamte Hygiene 31: in press.

LEBENSLAUF

Name:	Albrecht Moll
Geburtstag, -ort:	11.03.1955, Kiel
Schulbildung:	1961- 1967 Grundschule, Berlin, ab 1967 Besuch des Dreilinden- Gymnasiums (neusprachlicher Zweig mit Latein), Abitur im Dezember 1973.
Studium:	Studienbeginn zum Wintersemester 1974 an der FU Berlin im Fach Biologie. Vordiplomprüfung mit der Note "sehr gut" am 24.05 1977 abgelegt. Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel "Untersuchungen zur plasmidkodierten Serum- Resistenz bei E. coli" unter der Anleitung von Prof. Dr. K.N. Timmis am Max- Planck- Institut für molekulare Genetik in Berlin von Januar 1979 bis April 1980. Diplom- Prüfung am 20.6.1980 mit der Gesamtnote "sehr gut" abgelegt. 1981 Tätigkeit an der TH Darmstadt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Miltenburger mit dem Forschungsschwerpunkt "in vitro Replikation von insektenpathogenen Viren". Im SS 1982 Lehrtätigkeit an der FU Berlin. Seminarthema: "Krankheitserreger bei Insekten und ihre Anwendung in der biologischen Schädlingsbekämpfung". Seit Januar 1982 Arbeit an meiner Dissertation am Max- Planck- Institut für molekulare Genetik mit dem Titel "Untersuchung

des O1 Lipopolysaccharids und anderer antigener Determinanten von Escherichia coli mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern und Immunseren unter Anleitung von Ph. D. habil. M. Achtman.

Publikationen:

1) Moll, A. and Timmis, K.N. 1979. Plasmid- specified resistance to the bactericidal effect of serum. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 329.

2) Moll, A., Cabello, F., and Timmis, K.N. 1979. Rapid assay for the determination of bacterial resistance to the lethal activity of serum. FEMS Microbiol. Lett. 6, 273- 276.

3) Timmis, K.N., Moll, A. and Danbara, H. 1979. Plasmid gene that specifies resistance to the bactericidal activity of serum. in: Plasmids of medical, environmental and commercial importance. Elsevier, North Holland.

4) Moll, A., Manning, P. and Timmis, K.N. 1980. Plasmid-determined resistance to serum bactericidal activity: a major outer membrane protein, the traT gene product, is responsible for plasmid- specific serum resistance in Escherichia coli. Infect. Immun. 28, 359- 367.

5) Timmis, K.N., Manning, P.A., Echarti, C., Timmis, J.K. and Moll, A. 1981. Serum resistance in E. coli. In: Molecular biology, pathogenicity, and ecology of bacterial plasmids. Plenum Press, New York.

6) Manning, P.A., Timmis, J.K., Moll, A., and Timmis, K.N. 1982. Mutants that overproduce TraTp, a plasmid-specified major outer membrane protein of Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 187, 426- 431.